

MATERIAL DIDÁTICO



BIOLOGIA CELULAR

BIOLOGIA CELULAR

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	3
2	BIOLOGIA CELULAR E ULTRAESTRUTURAL	4
3	ORIGEM DA VIDA.....	6
3.1	Metabolismo celular - DÍAZ, 2017	7
4	ORIGEM E EVOLUÇÃO DAS CÉLULAS	9
4.1	Procariontes	10
4.2	Eucariontes	11
4.3	Organismos unicelulares e multicelulares	15
5	CONSTITUIÇÃO CELULAR.....	17
5.1	Lipídeos.....	18
5.2	Ácidos Nucléicos	19
5.3	Carboidratos.....	19
6	MEMBRANA CELULAR	20
6.1	Composição e estrutura das membranas.....	21
6.2	Fluidez da membrana.....	24
6.3	Principais funções da membrana	26
6.4	Especializações da membrana.....	32
7	NÚCLEO E CROMOSSOMOS - SÁ, 2014.....	34
7.1	Organização geral	35
7.2	Estrutura do envelope	35
7.3	Complexos de poro	37
7.4	Organização interna do núcleo.....	38
8	COMPONENTES CITOPLASMATICOS	41
9	FERRAMENTAS DA BIOLOGIA CELULAR - COOPER, 2016	46
9.1	Microscopia ótica.....	46

BIOLOGIA CELULAR

9.2 Microscopia eletrônica.....	53
9.3 Fracionamento subcelular	57
9.4 Crescimento de células animais em cultura	60
10 DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....	63
10.1 Diferenciação celular: especialização e diversidade	64
10.2 A biologia das células tronco.....	68
10.3 Terapias celulares: estratégias experimentais utilizando células-tronco, segundo SÁ, 2014.	76
11 BIBLIOGRAFIA.....	79

BIOLOGIA CELULAR

1 INTRODUÇÃO

Prezado aluno!

O Grupo Educacional FAVENI, esclarece que o material virtual é semelhante ao da sala de aula presencial. Em uma sala de aula, é raro – quase improvável - um aluno se levantar, interromper a exposição, dirigir-se ao professor e fazer uma pergunta, para que seja esclarecida uma dúvida sobre o tema tratado. O comum é que esse aluno faça a pergunta em voz alta para todos ouvirem e todos ouvirão a resposta. No espaço virtual, é a mesma coisa. Não hesite em perguntar, as perguntas poderão ser direcionadas ao protocolo de atendimento que serão respondidas em tempo hábil.

Os cursos à distância exigem do aluno tempo e organização. No caso da nossa disciplina é preciso ter um horário destinado à leitura do texto base e à execução das avaliações propostas. A vantagem é que poderá reservar o dia da semana e a hora que lhe convier para isso.

A organização é o quesito indispensável, porque há uma sequência a ser seguida e prazos definidos para as atividades.

Bons estudos!

BIOLOGIA CELULAR

2 BIOLOGIA CELULAR E ULTRAESTRUTURAL



Fonte: cienciahoje.org

A biologia celular, anteriormente denominada citologia, é a área da biologia relacionada ao estudo das células, tanto no que fere os conteúdos sobre a orfologia (ultraestrutura) e composição bioquímica das diversas estruturas celulares, bem como seus processos funcionais. Em razão da célula assumir o papel de estrutura fundamental dos seres seu estudo é de grande importância.

Considerando que as células são fatores que diferenciam o que é vida do que não possui vida — sendo a unidade estrutural e funcional básica de qualquer ser vivo, da mesma forma que o átomo é a unidade fundamental das estruturas químicas — podemos dizer que compreender a biologia celular é conhecer aspectos diversos essenciais à vida.

A partir da alta relevância e abrangência do tema, uma das responsabilidades da disciplina de biologia celular nas instituições de ensino é mostrar aos alunos, de uma forma sólida, tanto as teorias que regem a natureza quanto os aspectos técnicos, éticos e científicos do tema (RAIMUNDO, 2017).

A disciplina biologia celular representa um conhecimento fundamental para se entender os seres vivos, as suas funções e complexidade, além disso, permite ao aluno fazer associações com outras disciplinas (MELO, 2011, p. 8).

Contudo, apesar da importância do tema, a disciplina de biologia celular, é frequentemente reconhecida na comunidade acadêmica como “conteudista” e

BIOLOGIA CELULAR

abstrata, por isso, de difícil assimilação e muito trabalhosa para os docentes (MENDES, 2010).

A compreensão da biologia celular é uma área dinâmica de pesquisa que é fundamental para todas as ciências biológicas. Isto é verdade não somente do ponto de vista da pesquisa básica, mas também em relação a um número crescente de aplicações práticas na medicina, agricultura e biotecnologia. Principalmente com a conclusão da sequência do genoma humano, o progresso na biologia celular e molecular está abrindo novos horizontes, na prática da medicina. Exemplos notáveis incluem o desenvolvimento de novos fármacos especificamente, direcionadas a interferir no crescimento de células cancerosas e no uso potencial de células-tronco para suprir os tecidos danificados e tratar pacientes que sofrem de patologias como diabetes, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, lesões na coluna vertebral e doenças cardíacas.

Em virtude de a biologia celular e molecular ser uma área de pesquisa de rápido desenvolvimento, é relevante compreender sua base experimental, assim como o estado atual do nosso conhecimento.

A apreciação das semelhanças e diferenças entre as células é de vital importância para a compreensão da biologia celular.

Por um lado, todas as células compartilham propriedades fundamentais únicas que têm sido conservadas durante a evolução. Por exemplo, todas as células utilizam o DNA como material genético, são circundadas por membranas plasmáticas e usam os mesmos mecanismos básicos para o metabolismo energético. Por outro lado, as células atuais desenvolveram uma grande variedade de modos de vida. Muitos organismos, como bactérias, amebas e leveduras, são constituídos de células isoladas que são capazes de se replicar independentemente (JUNQUEIRA, 2013 apud COO-PER, 2016).

BIOLOGIA CELULAR

3 ORIGEM DA VIDA



Fonte: hypescience.com

Acredita-se que biomoléculas complexas surgiram pela agregação física aleatória de substâncias químicas. Alguns experimentos realizados, simulando as condições iniciais da terra, têm confirmado que a síntese abiótica de biomoléculas é possível sob as condições da atmosfera primitiva (PARKER et al. 2011).

A fase decisiva que deu lugar a evolução da vida, não obstante, foi a aparição dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), as moléculas da hereditariedade, as quais são especializadas no armazenamento, transmissão e uso de informação genética (MILLER et al. 1974 apud DÍAZ, 2017).

Estas moléculas são capazes de auto replicar-se e também funcionam como modelo para a sínteses de proteínas, as quais, por sua vez, são grandes moléculas estáveis com formas complexas e variáveis que interagem numa grande série de reações químicas com outras moléculas e cuja função básica é executar as tarefas dirigidas pela informação transportada pelos ácidos nucleicos. Até aqui, a comunidade científica concorda que as proteínas, ácidos nucleicos, e lipídios forneceram a matéria prima para a aparição da vida na terra. É bem estabelecido que a evolução da vida passou por uma primeira etapa na qual o RNA desempenhou papel central na hereditariedade e catálise – papéis que atualmente são desempenhados pelo DNA e enzimas proteicas, respectivamente. Acredita-se que o RNA proporcionou a plataforma intermediária necessária entre os produtos químicos pré-bióticos e o DNA, seu descendente de cadeia dupla e mais estável.

BIOLOGIA CELULAR

Presume-se que a primeira célula tenha originado-se da inclusão de RNA's autoreplicativos em uma membrana composta de fosfolipídios. Os fosfolipídios são os componentes básicos de todas as membranas biológicas atuais, incluindo as membranas plasmáticas de células procarióticas e eucarióticas. A característica-chave dos fosfolipídios que formam as membranas é que eles são moléculas anfipáticas, significando que uma porção da molécula é solúvel em água e a outra porção é insolúvel. Os fosfolipídios têm longas caudas de hidrocarbonetos insolúveis em água (hidrofóbica) ligadas a uma cabeça com grupos fosfato solúvel em água (hidrofílica). Quando colocados na água, os fosfolipídios agregam-se espontaneamente em uma bicamada, com suas cabeças com grupos fosfato na porção exterior em contato com a água e suas caudas de hidrocarbonetos no interior em contato umas com as outras. Tais bicamadas de fosfolipídios formam uma barreira estável entre dois compartimentos aquosos – por exemplo, separando o interior de uma célula do meio externo.

A inclusão do RNA auto-replicativo e de moléculas associadas em uma membrana

de fosfolipídios poderia tê-los mantido, assim, como uma unidade, capaz de auto replicação e posterior evolução. A síntese de proteína controlada por RNA já poderia ter sido desenvolvida neste tempo, no qual a primeira célula poderia ser constituída de um RNA auto-replicativo e das proteínas por ele codificadas.

3.1 Metabolismo celular - DÍAZ, 2017

O termo metabolismo é usado para descrever todas as transformações moleculares e químicas que acontecem nas células e organismos vivos. Estas reações são muito complexas e envolvem muitas fases dado que a energia liberada na formação ou destruição de moléculas poderia incinerar a própria célula se uma única reação bioquímica ocorresse. No que segue descreveremos a grosso modo a evolução dos

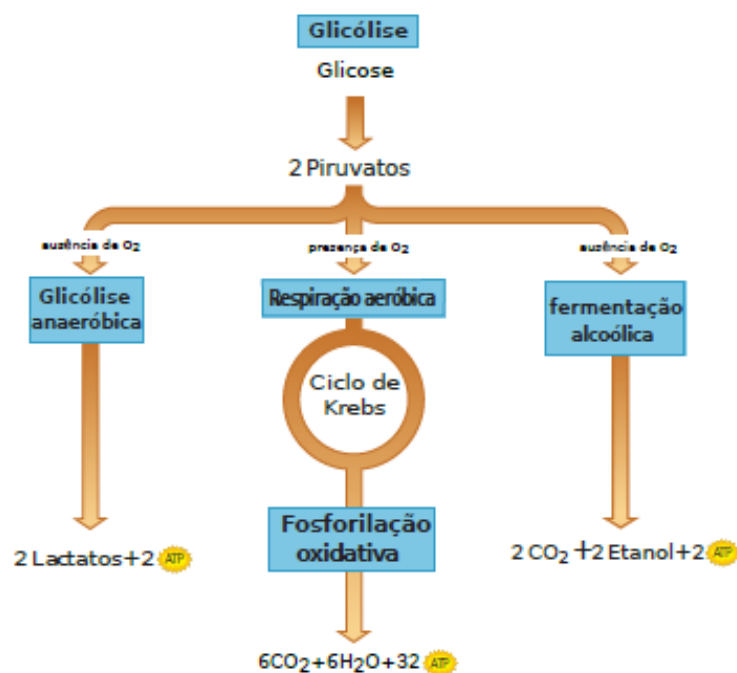
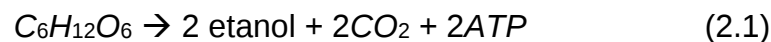
mecanismos de produção de ATP nas células.

Devido à escassez ou falta de oxigênio na composição da atmosfera primitiva, as primeiras reações geradoras de energia envolveram presumivelmente a degradação de moléculas orgânicas na ausência deste elemento. Em células não-

BIOLOGIA CELULAR

fotossintéticas, o combustível químico mais comum é a glicose ($C_6H_{12}O_6$). A primeira fase do metabolismo da glicose recebe o nome de *glicólise*. Neste processo, através de uma série de reações químicas a glicose é convertida em duas moléculas de piruvato. Cada reação química nesta via metabólica é catalisada por uma enzima específica. Sem a presença de oxigênio o piruvato pode seguir dois caminhos.

Em organismos capazes de realizar *fermentação alcoólica*, como as leveduras (micróbios eucariotas) ou certas bactérias, o piruvato é reduzido para produzir etanol. Na outra via, de maior ocorrência na natureza e conhecida como *glicólise anaeróbica* para distinguir-se do processo inicial de glicólise, o piruvato é reduzido para formar lactato. Aqui, a quebra da glicose é incompleta, já que o lactato e etanol são moléculas ainda ricas energeticamente. A ruptura da glicose pode ser resumida nas equações (2.1) e (2.2), respectivamente. Podemos então ver que nestes processos, duas moléculas de ATP são produzidas por cada molécula de glicose. Nestes processos só nos interessa conhecer a quantidade de ATP criado ao final de cada via metabólica, por isso não aprofundamos nos detalhes de cada reação. O esquema abaixo mostra de forma geral as vias metabólicas que se seguem a partir da quebra da glicose com e sem a presença de O_2 .



BIOLOGIA CELULAR

Esquema dos processos que seguem as duas moléculas de piruvato depois de serem sintetizadas a partir de uma molécula de glicose. Na presença de O_2 (processo aeróbico) o piruvato é oxidado em CO_2 e H_2O mediante o ciclo de Krebs liberando no processo total 32 moléculas de ATP. Na ausência de O_2 o piruvato sintetiza lactato e etanol nos subprocessos chamados de glicólise anaeróbica e fermentação alcoólica, respectivamente, 2 moléculas de ATP são liberadas. Imagem editada de (CAMPBELL, 2011).

4 ORIGEM E EVOLUÇÃO DAS CÉLULAS



Fonte: labresearch.com

As células são divididas em dois tipos principais, definidos pela presença ou não de uma membrana que delimita o núcleo. As células procarióticas (bactérias) não apresentam um envelope nuclear e as células eucarióticas que possui um núcleo, no qual o material genético está separado do citoplasma por uma membrana nuclear. As células procarióticas geralmente são menores e mais simples do que as células eucarióticas, além da ausência de núcleo, seus genomas são menos complexos e elas não apresentam organelas citoplasmáticas ou um citoesqueleto.

Ainda que exista essas diferenças, os mesmos mecanismos moleculares básicos controlam a vida de ambas, procarióticas e eucarióticas, indicando que todas as células atuais descendem de um ancestral primordial comum.

BIOLOGIA CELULAR

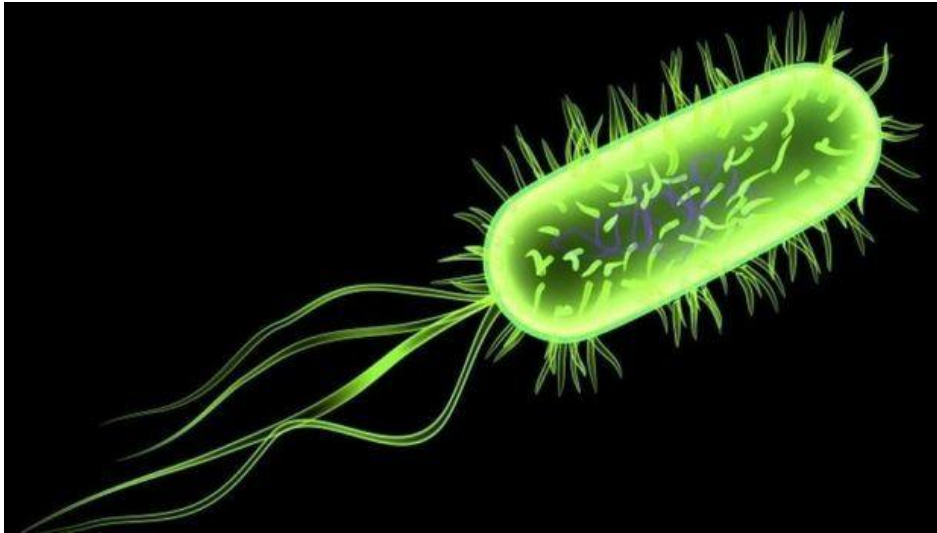
4.1 Procariontes

Os procariotos, que incluem todos os diversos tipos de bactérias, são divididos em dois grupos – as arqueobactérias e as eubactérias – que divergiram precocemente na evolução. Algumas arqueobactérias vivem em ambientes extremos, que atualmente são raros, mas que poderiam ter sido predominantes na terra primitiva. Por exemplo, os termoacidófilos vivem em fontes térmicas sulfurosas com temperaturas tão altas quanto 80°C e pH tão baixo quanto. As eubactérias incluem as formas comuns das bactérias atuais – um grande grupo de organismos que vive em uma ampla variedade de ambientes, incluindo solo, água e outros organismos (por exemplo, patógenos humanos).

Muitas células bacterianas são esféricas, em forma de bastonete ou espirais, com diâmetros de 1 a 10 µm. O conteúdo de DNA varia entre 0,6 milhão e 5 milhões de pares de bases, uma quantidade suficiente para codificar aproximadamente 5.000 proteínas diferentes. As cianobactérias são os maiores e mais complexos procariotos, bactérias que desenvolveram a fotossíntese (COOPER, 2016 apud PEIXOTO, 2017).

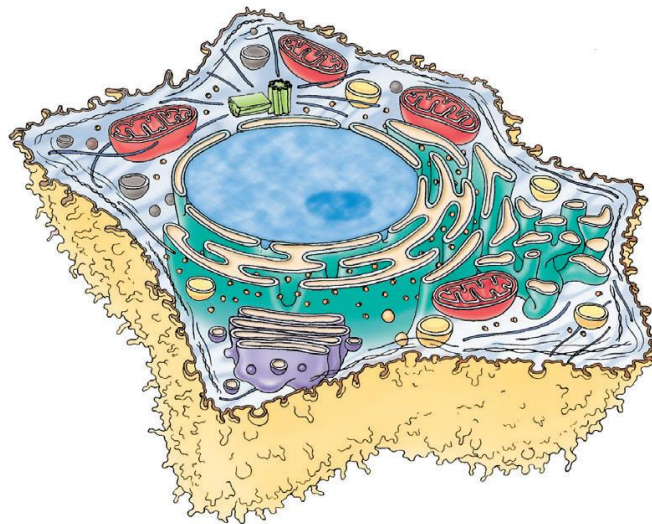
A estrutura de uma célula procariótica típica é ilustrada pela *Escherichia coli* (*E. coli*), uma bactéria comum, habitante do trato intestinal dos humanos. A célula é um bastonete, com aproximadamente 1 µm de diâmetro e 2 µm de comprimento. Como a maioria dos outros procariotos, a *E. coli* é circundada por uma parede celular rígida composta de polissacarídeos e peptídeos. Dentro da parede celular está a membrana plasmática, que é uma bicamada de fosfolipídios e proteínas associadas. Enquanto a parede celular é porosa e facilmente penetrada por uma variedade de moléculas, a membrana plasmática fornece a separação funcional entre o interior da célula e o ambiente externo. O DNA da *E. coli* é uma molécula circular única no nucleóide, o qual, em contraste com o núcleo dos eucariotos, não é circundado por uma membrana que o separa do citoplasma. O citoplasma contém aproximadamente 30.000 ribossomos (o local da síntese protéica), que contribuem para sua aparência granular. Abaixo imagem de uma *E. coli*.

BIOLOGIA CELULAR



Fonte: gentside.com.

4.2 Eucariontes



Célula animal

As células eucarióticas são muito mais complexas e apresentam um núcleo, organelas citoplasmáticas e um citoesqueleto. A maior e mais proeminente organela das células eucarióticas é o núcleo, com um diâmetro de aproximadamente 5 μm . O núcleo contém a informação genética da célula, que nos eucariotos é organizada como uma molécula de DNA linear, em vez de circular. O núcleo é o local da replicação do DNA e da síntese do RNA; a tradução do RNA em proteínas ocorre em ribossomos no citoplasma.

BIOLOGIA CELULAR

Além do núcleo, as células eucarióticas apresentam no citoplasma uma variedade de organelas circundadas por membranas. Essas organelas formam compartimentos nos quais se localizam as diferentes atividades metabólicas. Normalmente, as células eucarióticas são maiores que as células procarióticas, com um volume celular de, no mínimo, mil vezes maior. A compartimentalização causada pelas organelas citoplasmáticas é que permite o funcionamento eficiente das células eucarióticas. Duas dessas organelas, as mitocôndrias e os cloroplastos, exercem papel fundamental no metabolismo energético. As mitocôndrias, que são encontradas em quase todas as células eucarióticas, são os locais do metabolismo oxidativo e são responsáveis pela geração da maior parte do ATP derivado da quebra de moléculas orgânicas.

Os cloroplastos são os locais da fotossíntese e são encontrados somente nas células de plantas e algas verdes.

Os lisossomos e os peroxissomos também fornecem compartimentos metabólicos especializados para a digestão de macromoléculas e várias reações oxidativas, respectivamente. Além disso, a maioria das células vegetais contém grandes vacúolos que executam uma variedade de funções, incluindo a digestão de macromoléculas e a estocagem de produtos de excreção e nutrientes (DE ROBERTS, 2006 apud BARBOSA, 2017).

Devido ao tamanho e à complexidade das células eucarióticas, o transporte de proteínas para seus destinos corretos é uma tarefa extremamente complexa. Duas organelas citoplasmáticas, o retículo endoplasmático e o complexo de golgi, são dedicadas especificamente para a organização e o transporte de proteínas destinadas à secreção, à incorporação à membrana plasmática e à incorporação aos lisossomos.

O retículo endoplasmático é uma extensa rede de membranas intracelulares, estendendo-se a partir da membrana nuclear por todo o citoplasma. Ele funciona não somente no processamento e transporte de proteínas, mas também na síntese de lipídeos. As proteínas são transportadas em pequenas vesículas a partir do retículo endoplasmático para o complexo de golgi, onde são processadas e organizadas para o transporte ao destino final. Além do papel no transporte de proteínas, o complexo de golgi serve como local da síntese de lipídeos e (em células vegetais) como local de síntese de alguns polissacarídeos que formam a parede celular. As células eucarióticas têm outro nível de organização interna: o citoesqueleto, uma rede de filamentos protéicos que se estende por todo o citoplasma. O citoesqueleto fornece a estrutura da célula, determinando o formato celular e gerando a organização do

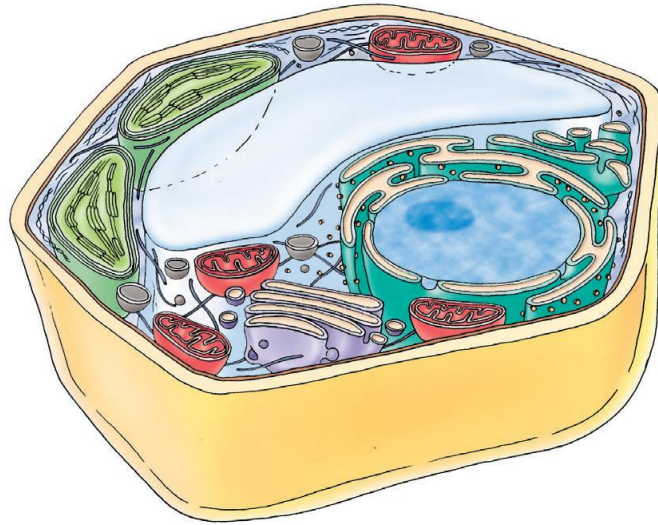
BIOLOGIA CELULAR

citoplasma. Além disso, o citoesqueleto é responsável pelos movimentos da célula inteira (por exemplo, a contração das células musculares), pelo transporte intracelular e pelo posicionamento das organelas e outras estruturas, incluindo o movimento dos cromossomos durante a divisão celular.

Os eucariotos surgiram há pelo menos 2,7 bilhões de anos, seguindo em 1 a 1,5 bilhão de anos a evolução dos procariotos. Estudos das sequências de DNA indicam que as arqueobactérias e eubactérias são tão diferentes entre si quanto são dos eucariotos atuais. Portanto, um evento muito precoce na evolução parece ter sido a divergência dos três grupos de descendentes a partir de um ancestral comum, originando as atuais arqueobactérias, as eubactérias e os eucariotos. De forma interessante, muitos genes de arqueobactérias são mais parecidos com os de eucariotos que com os de eubactérias, indicando que as arqueobactérias e os eucariotos compartilham uma linha evolutiva em comum e são mais proximamente relacionados um ao outro do que qualquer um dos dois às eubactérias (COOPER, 2016 apud ALBERTS 2017).

Uma etapa crítica na evolução das células eucarióticas foi a aquisição das organelas subcelulares circundadas por membranas, permitindo o desenvolvimento das características complexas dessas células. Supõe-se que as organelas tenham sido adquiridas como o resultado de uma associação de células procarióticas com eucariotos ancestrais. A hipótese de que células eucarióticas evoluíram a partir de uma associação de simbiose com procariotos – endossimbiose – é bem sustentada pelos estudos de mitocôndria e cloroplastos, os quais supõe-se terem evoluído a partir de bactérias que viviam em células maiores. Ambos, mitocôndrias e cloroplastos, são similares às bactérias em tamanho, e como bactérias, reproduzem-se por divisão binária. E o mais importante, ambos, mitocôndrias e cloroplastos, contêm seu próprio DNA, o qual codifica alguns dos seus componentes. Os DNA's de mitocôndrias e cloroplastos são replicados cada vez que a organela se divide, e os genes que eles codificam são transcritos dentro da organela e traduzidos no ribossomo da organela.

BIOLOGIA CELULAR



Célula Vegetal

A mitocôndria e o cloroplasto contêm seus próprios sistemas genéticos, que são diferentes do usado no genoma nuclear da célula. Além disso, o ribossomo e o RNA ribossomal dessas organelas são mais proximamente relacionados com os de bactérias do que com os codificados pelo genoma nuclear dos eucariotos. A origem dessas organelas por endossimbiose é amplamente aceita, e supõe-se que a mitocôndria tenha evoluído de bactérias aeróbicas e o cloroplasto, de bactérias fotossintéticas, como as cianobactérias.

A aquisição de bactérias aeróbicas poderia ter fornecido a uma célula anaeróbica a capacidade de realizar reações de metabolismo oxidativo. A aquisição de bactérias fotossintéticas poderia ter fornecido a independência nutricional proporcionada pela habilidade de efetuar a fotossíntese. Dessa maneira, essas associações por endossimbiose foram altamente vantajosas e foram positivamente selecionadas pela evolução. Ao longo do tempo, a maioria dos genes originalmente presentes nas bactérias foi, aparentemente, incorporada no genoma nuclear da célula, e somente poucos componentes da mitocôndria e do cloroplasto ainda são codificados pelos genomas das organelas.

4.3 Organismos unicelulares e multicelulares



Fonte: pt.nextews.com

Alguns eucariotos são organismos unicelulares que, como as bactérias, consistem em somente uma única célula capaz de auto replicação. Os eucariotos mais simples são as leveduras. As leveduras são mais complexas que as bactérias, porém menores e mais simples que as células de animais e plantas. Por exemplo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem aproximadamente 6 μm de diâmetro e seu DNA contém 12 milhões de pares de bases. Entretanto, outros eucariotos unicelulares são células muito mais complexas, algumas contendo tanto DNA quanto as células humanas. Eles incluem organismos especializados para realizar uma grande variedade de ações, incluindo a fotossíntese, o movimento e a captura e ingestão, como alimento, de outros organismos. Por exemplo, a *Amoeba proteus* é uma célula grande e complexa. Seu volume é mais de 100.000 vezes o de uma *Echericha coli* e seu comprimento excede 1 mm, quando a célula está totalmente estendida.

As amebas são organismos com alta mobilidade que usam extensões citoplasmáticas, chamadas de pseudópodes, para mover e para englobar outros organismos, incluindo bactérias e leveduras, como alimentos. Outros organismos eucariotos unicelulares (como algas verdes) contêm cloroplastos e são capazes de realizar fotossíntese. Os organismos multicelulares evoluíram a partir de eucariotos unicelulares há, pelo menos, 1,7 bilhão de anos.

BIOLOGIA CELULAR

Alguns eucariotos unicelulares formam agregados multicelulares que parecem representar uma transição evolutiva entre células individuais e organismos multicelulares. Por exemplo, as células de muitas algas (como a alga verde *Volvox*) associam-se umas com as outras para formarem colônias multicelulares, que se supõe terem sido os precursores evolutivos das plantas atuais. O aumento da especialização celular direcionou a transição de agregados coloniais para verdadeiros organismos multicelulares (COOPER, 2016 apud MANFIO, 2018).

A contínua especialização celular e a divisão de tarefas entre as células do organismo levaram à complexidade e diversidade observadas entre os diferentes tipos de células que compõem as plantas e os animais atuais, incluindo os seres humanos. As plantas são compostas por uma menor variedade de tipos celulares que os animais, mas cada tipo diferente de célula vegetal é especializado para realizar uma função específica necessária para o organismo como um todo. As células das plantas são organizadas em três principais sistemas de tecidos: tecido de sustentação, tecido dérmico e tecido vascular. O tecido de sustentação contém as células do parênquima, que realizam a maioria das reações metabólicas das plantas, incluindo a fotossíntese.

O tecido de sustentação também contém dois tipos de células especializadas (célula do colênquima e célula do esclerênquima), que são caracterizadas pelas grossas paredes celulares e fornecem o suporte estrutural para a planta. O tecido dérmico cobre a superfície da planta e é composto de células epidérmicas, formando uma camada de proteção e permitindo a absorção de nutrientes. Finalmente, diversos tipos de células alongadas formam o sistema vascular (o xilema e o floema), que é responsável pelo transporte de água e nutrientes por toda a planta. As células encontradas nos animais são consideravelmente mais diversificadas que as das plantas.

O corpo humano, por exemplo, é composto por mais de 200 tipos diferentes de células que geralmente são consideradas os componentes de cinco tipos principais de tecidos: tecido epitelial, tecido conectivo, sangue, tecido nervoso e músculo. As células epiteliais formam camadas que cobrem a superfície do corpo e recobrem os órgãos internos. Há muitos tipos diferentes de células epiteliais, cada um especializado para uma função específica, incluindo proteção (a pele), absorção (por exemplo, as células da mucosa do intestino delgado) e secreção (por exemplo, as células da glândula salivar). O tecido conectivo inclui ossos, cartilagens e tecido adiposo, cada um formado por diferentes tipos de células (respectivamente, osteoblastos, condrócitos e adipócitos). O tecido conectivo frouxo, que intercala as

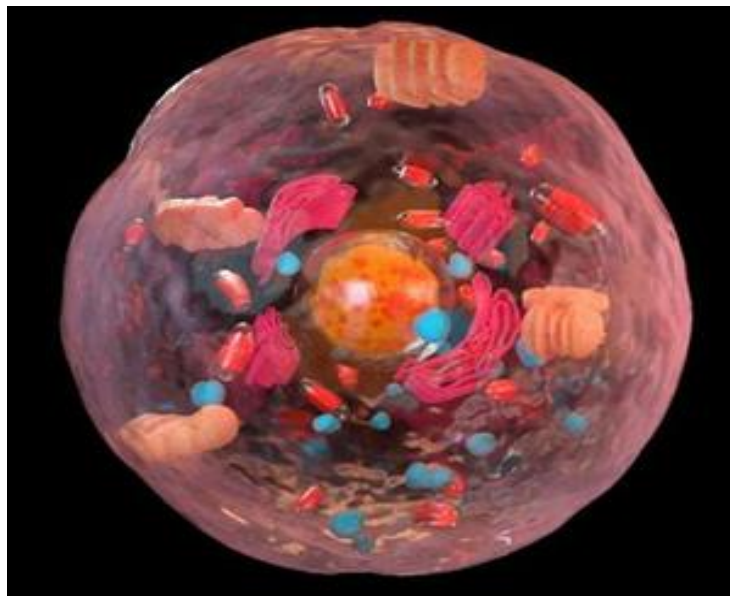
BIOLOGIA CELULAR

camadas epiteliais e preenche os espaços entre órgãos e tecidos do corpo, é formado por outro tipo de célula, o fibroblasto.

O sangue contém vários tipos diferentes de células, que funcionam no transporte do oxigênio (células vermelhas ou eritrócitos), nas reações inflamatórias (granulócitos, monócitos e macrófagos) e na resposta imunológica (linfócitos). O tecido nervoso é composto pelas células nervosas, ou neurônios, que são altamente especializadas para transmitir sinais através do corpo. Vários tipos de células sensoriais, como as células dos olhos e dos ouvidos, são mais especializados para receberem sinais externos do ambiente. Finalmente, vários diferentes tipos de células musculares são responsáveis pela produção da força e do movimento.

Claramente, a evolução dos animais envolveu o desenvolvimento de uma considerável diversidade e especialização no nível celular. A compreensão dos mecanismos de controle do crescimento e de diferenciação em tal grupo complexo de células especializadas, originadas a partir de um único ovo fertilizado, é um dos principais desafios que se apresentam à biologia celular e molecular contemporânea.

5 CONSTITUIÇÃO CELULAR



Fonte: conhecimentocientifico.r7.com

BIOLOGIA CELULAR

Lipídeos, carboidratos, ácidos nucleicos e proteínas são macromoléculas presentes, aproximadamente nas mesmas proporções, em todos os organismos vivos. Essas são formadas pela união de moléculas menores, denominadas de monômeros, através de ligações covalentes. Estes podem ou não ser idênticos, mas eles têm estruturas químicas similares. Basicamente, as moléculas com massas moleculares acima de 1.000 são consideradas macromoléculas.

5.1 Lipídeos.

Os lipídeos são compostos cuja natureza química é extremamente variada. Uma propriedade que todos dividem está na solubilidade em solventes orgânicos e insolubilidade em água, que é devida a presença de muitas ligações covalentes apolares. Quando moléculas apolares estão próximas suficientemente, forças de van der Waals fracas, mas aditivas, as mantêm unidas. Estas enormes agregações moleculares não são polímeros em um sentido químico restrito, já que suas unidades (moléculas de lipídeos) não estão unidas por ligações covalentes, como estão os aminoácidos nas proteínas. Contudo, elas são consideradas polímeros de unidades lipídicas individuais. No organismo, de maneira geral, a gordura da dieta desempenha várias funções biológicas importantes, tais como:

- isolantes térmicos;
- isolantes elétricos;
- agentes emulsificantes;
- fornecimento de vitaminas (A, D, E, K);
- fonte de armazenamento de energia;
- transporte de combustível metabólico;
- componentes de biossinalização intra e intercelulares e precursores de substâncias essenciais.

Alguns seres podem sintetizar alguns carboidratos a partir de gorduras e proteínas, entretanto, a maior parte dos carboidratos é oriunda de plantas. Nos seres humanos, o metabolismo da glicose é a principal fonte de suprimento energético. A partir da glicose, uma série de intermediários metabólicos podem ser formados, como os esqueletos carbônicos de aminoácidos, nucleotídeos, ácidos graxos entre outros (NELSON, 2014 apud VENÂNCIO, 2018).

Os polímeros de carboidratos (ou glicanos) atuam como elementos estruturais e protetores nas paredes celulares bacterianas e vegetais e também nos tecidos

BIOLOGIA CELULAR

conjuntivos animais, lubrificam as articulações e auxiliam no reconhecimento e adesão intercelular, atuam como sinais que determinam a localização intercelular ou o destino metabólico destas moléculas híbridas denominadas de glicoconjugados e desempenham funções de reserva de energia. Esta reserva de energia é armazenada em ligações covalentes fortes tais como: C C ou C O.

Muitos carboidratos têm a fórmula empírica $(CH_2O)_n$ alguns apresentam nitrogênio, fósforo ou enxofre. Carboidratos são poliidroxiáldeídos e poliidroxicetonas ou ainda substâncias iônicas que se hidrolisam, que vão dar origem a aldeídos e cetonas poliidroxiadas. Embora, esta definição acentue os grupos funcionais importantes dos carboidratos, não é completamente adequada. Apesar dos carboidratos apresentarem carbonilas (C=O) e hidroxilas (O-H) eles existem preferencialmente na forma cíclica como hemiacetais ou de hemicetais.

5.2 Ácidos Nucléicos

Os ácidos nucleicos são macromoléculas lineares de nucleotídeos unidos por ligação fosfodiéster entre o C3' (carbono 3') de um nucleotídeo e o C5' do nucleotídeo seguinte, especializadas na transmissão, no armazenamento e no uso da informação. São, portanto, macromoléculas formadas por nucleotídeos.

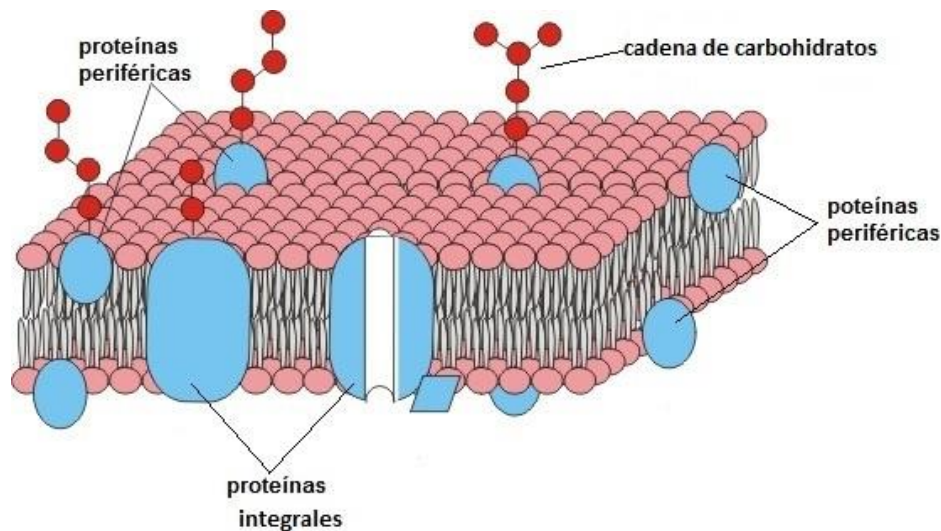
Existem dois tipos de ácidos nucleicos: RNA (ácido ribonucleico) e DNA (ácido desoxirribonucleico).

5.3 Carboidratos

São as biomoléculas mais amplamente distribuídas na Terra. O carboidrato mais importante é a glicose (monossacarídeo). Nas plantas, a glicose é sintetizada a partir de dióxido de carbono (CO_2) e água, na fotossíntese, e, é armazenada como amido ou é convertida na celulose responsável pela sustentação da planta.

BIOLOGIA CELULAR

6 MEMBRANA CELULAR



Fonte: celula2017.weebly.com

É a parte mais externa do citoplasma, que separa a célula do meio extracelular, contribuindo para manter constante o meio intracelular, que é diferente do meio extracelular. Apresenta cerca de 7 a 10 nm de espessura e é mostrada nas eletromicrografias como duas linhas escuras separadas por uma linha central clara. Essa estrutura trilaminar é comum às outras membranas encontradas nas células, sendo, por isso, chamada unidade de membrana ou membrana unitária (DE ROBERTIS, 2006).

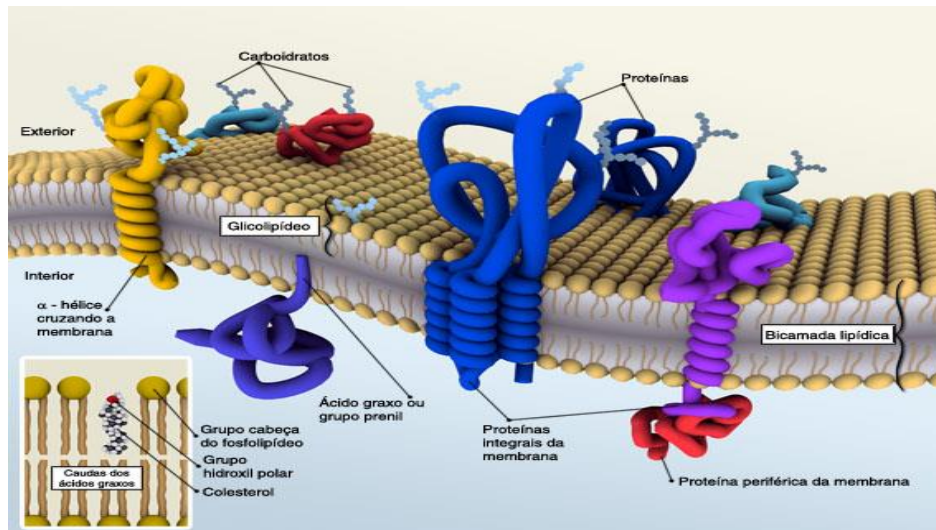
Este envoltório não representa apenas uma barreira inerte, mas possui também, inúmeras funções:

- Responsável pela constância do meio intracelular e do interior de organelas;
- Participa do processo de reconhecimento celular e da adesão entre células e elementos da matriz extracelular através de proteínas e glicoproteínas específicas;
- Participa do mecanismo de sinalização celular, devido à presença de receptores para fatores de crescimento, hormônios, dentre outras moléculas sinalizadoras, além da presença de alguns elementos do sistema de transdução de sinal (ex.: proteínas G e receptores com função de quinases);

BIOLOGIA CELULAR

- Funciona como suporte para enzimas pertencentes a uma mesma via metabólica ou cadeia transportadora de elétrons permitindo uma melhor dinâmica sequencial do processo;
- Promove o controle da entrada e saída de moléculas e íons na célula, bem como, em suas organelas, através da propriedade de permeabilidade seletiva conferida pela estrutura básica da membrana e por proteínas transportadoras;
- Participa dos processos de endocitose, transcitose e exocitose (já visto posteriormente neste capítulo), além de promover processos de deslocamentos de compostos pelo citoplasma e envio de moléculas de uma organela para outra, através da formação e fusão de vesículas contendo o elemento a ser transportado;
- Participa de processos de comunicações entre as células;
- Funciona como isolante elétrico na bainha de mielina;
- Possui outras funções específicas particulares de algumas membranas.

6.1 Composição e estrutura das membranas



Fonte: COOPER, 2016

As unidades de membrana são bicamadas lipídicas formadas principalmente por fosfolípidios e que contêm uma quantidade variável de moléculas proteicas, mais

BIOLOGIA CELULAR

numerosas nas membranas com maior atividade funcional (as proteínas são responsáveis pela maioria das funções da membrana). O folheto externo da bicamada lipídica da membrana plasmática apresenta muitas moléculas de glicolipídios, com as porções glicídicas se projetando para o exterior da célula. Às porções glicídicas dos glicolipídios se juntam porções glicídicas das proteínas da própria membrana, mais glicoproteínas e proteoglicanas secretadas, que são adsorvidas pela superfície celular para formar um conjunto denominado glicocálice. Assim, o glicocálice é uma projeção da parte mais externa da membrana, com apenas algumas moléculas adsorvidas, e não uma camada inteiramente extracelular, como se pensou inicialmente (DE ROBERTIS, 2006).

Apesar das diferenças nas funções desempenhadas pelas membranas citoplasmáticas que envolvem diferentes tipos celulares, assim como, entre as membranas de diversas organelas, podemos observar que todas as membranas compartilham, invariavelmente, a mesma composição e estrutura básica (BARRETO, 2014).

Em geral, a fração lipídica corresponde a 50%, do mesmo modo que a fração proteica, enquanto os carboidratos, menos numerosos, se encontram associados a proteínas ou aos lipídios (como glicoproteínas ou glicolipídios, respectivamente).

Entretanto, existem diferenças quantitativas e qualitativas na composição das membranas que envolvem os diferentes tipos celulares ou diferentes organelas. A disposição dos elementos na membrana é assimétrica e permite o deslocamento principalmente da fração lipídica, motivo pelo qual as membranas são consideradas mosaicos fluidos. De fato, existem alguns tipos de proteínas localizadas na superfície voltadas para o meio extracelular (ectoproteínas), enquanto outras estão localizadas na camada em contato com o citoplasma (endoproteínas). Do mesmo modo, a disposição dos diferentes tipos de lipídios na bicamada é assimétrica e a fração de carboidratos está preferencialmente exposta no meio extracelular, assim como as proteoglicanas.

Grande parte dos lipídios que compõem a bicamada lipídica (glicerofosfolipídios, esfingofosfolipídios e glicolipídios) possuem cabeça polar ou hidrofílica e caudas apolares ou hidrofóbicas (compostas de longas cadeias de hidrocarboneto), sendo assim, anfipáticos. Esta característica é essencial para formação e manutenção da bicamada lipídica, uma vez que, as caudas apolares tendem a se localizar no interior da bicamada, enquanto as cabeças polares ficam expostas ao meio aquoso citoplasmático ou extracelular (JUNQUEIRA, 2013 apud BORGES, 2018).

BIOLOGIA CELULAR

Os lipossomas são estruturas compostas por uma bicamada lipídica fechada com os ácidos graxos dos fosfolipídios (caudas hidrofóbicas destacadas em amarelo) e estão voltados para o interior da bicamada (assim como nas membranas celulares), enquanto as micelas são vesículas compostas de uma única monocamada fechada, dispondo os ácidos graxos no interior da vesícula. Além disso, em todos os casos, as cabeças polares (hidrofílicas) dos lipídios estão expostas ao meio aquoso. Esta organização também pode ser observada em lipossomas, estruturas compostas por uma bicamada lipídica fechada, com diâmetro de 0,25 até 1 μm , que se formam quando fosfolipídios são adicionados a soluções aquosas.

Uma estrutura distinta que se forma quando lipídios que possuem uma única cauda de hidrocarboneto são expostos a condições semelhantes são as micelas, vesículas de diâmetro menor (geralmente de 0,001 até 0,1 μm de diâmetro) compostas de uma única monocamada fechada, com a cabeça exposta para a fase aquosa e as caudas voltadas para o interior da vesícula.

A bicamada lipídica das membranas é composta de diferentes grupos de lipídios anfipáticos, os fosfolipídios (glicerofosfolípideos e esfingofosfolipídios), os glicolipídios (cerebrosídeos e gangliosídeos) e o colesterol, vale lembrar que os glicerofosfolipídios, principais componentes da membrana, possuem longas cadeias hidrofóbicas de hidrocarbonetos dos ácidos graxos, associadas com uma parte hidrofílica, composta de glicerol e um álcool (serina, colina, etanolamina ou inositol). Desta forma, dependendo do álcool associado, os glicerofosfolipídios podem ser chamados de fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina ou fosfatidilinositol, cujas disposições na membrana ocorrem de forma assimétrica ((DE ROBERTS, 2006 apud BARRETO, 2014).

A fosfatidilserina, a fosfatidiletanolamina e o fosfatidilinositol são predominantes na face da membrana voltada para o citosol, enquanto a fosfatidilcolina está em maior concentração na face da membrana voltada para o meio extracelular. Vale mencionar, também, que a assimetria na disposição de fosfolipídios carregados. (como a fosfatidilserina, que é carregada negativamente) contribui para diferença de cargas entre as duas faces da membrana, em que a face voltada para o citosol é carregada negativamente, enquanto a face voltada para o meio extracelular possui carga positiva. Outro tipo de fosfolipídio, o esfingofosfolipídio, possui longas cadeias hidrofóbicas de hidrocarbonetos, associadas com uma parte hidrofílica, composta de serina e um álcool (colina), sendo denominado esfingomielina. Este lipídio apresenta-se em grande quantidade na face da bicamada voltada para o meio extracelular de

BIOLOGIA CELULAR

células formadoras da bainha de mielina, promovendo o isolamento elétrico dos axônios.

Por sua vez, os cerebrosídeos e os gangliosídeos, os quais possuem em sua composição um resíduo (galactose ou glicose) ou vários resíduos de monossacarídeos, respectivamente, encontram-se na face externa da membrana citoplasmática ou na face da membrana de organelas voltada para o lúmen das mesmas, do mesmo modo que a fração glicídica de glicoproteínas. Nestes locais, estes compostos desempenham importantes funções como:

- Reconhecimento celular;
- Adesão celular;
- Proteção química contra enzimas hidrolíticas e outros compostos proteção mecânica;
- Determinação do tipo sanguíneo (participação da identidade de eritrócitos), contribuem para o isolamento elétrico de neurônios, atração de íons (principalmente cátions) e água. Na face da membrana citoplasmática voltada para o meio extracelular, podemos observar uma grande quantidade da fração glicídica da membrana, chamada glicocálix ou glicocálice, que possui muitas das funções descritas anteriormente.

Finalmente, o colesterol, outro tipo de lipídio anfipático que compõe as membranas, um pouco menos numeroso que os fosfolipídios de membrana, organiza-se entre os fosfolipídios, com seu grupamento hidroxila do C3 do núcleo cíclico orientado para a solução aquosa do citosol ou do meio extracelular. Este grupo de lipídio possui grande importância para a manutenção da fluidez da membrana.

6.2 Fluidez da membrana

Os movimentos das moléculas constituintes, principalmente da fração fosfolipídica, está relacionado com a fluidez da membrana. Os fosfolipídios de membrana podem mover-se por difusão lateral, deslocando-se ao longo da superfície de uma das camadas da membrana, rotacionalmente em volta do próprio eixo, promover flexão dos ácidos graxos, ou até, mais raramente, passar de uma camada para outra, em um movimento chamado flip-flop (semelhante a uma cambalhota) (LIMA, 2019).

BIOLOGIA CELULAR

Esses deslocamentos podem ser influenciados pela temperatura, tamanho e grau de saturação dos ácidos graxos, bem como pela porcentagem de colesterol nas membranas. De fato, as duplas ou triplas ligações presentes nos ácidos graxos insaturados promovem angulações na molécula que levam ao maior afastamento entre os lipídios de membrana e, conseqüente, a um menor grau de compactação, o que facilita seu movimento (LOTTENBERG, 2009).

Do mesmo modo, ácidos graxos de cadeia curta também facilitam o movimento das moléculas, aumentando a fluidez. Ao contrário, as moléculas de colesterol e ácidos graxos saturados promovem maior grau de compactação lipídica na membrana, dificultando o movimento e, assim, diminuindo a fluidez.

As proteínas que compõem as membranas também podem girar em torno do seu próprio eixo ou se deslocar lateralmente na superfície da membrana, apesar de possuírem um movimento mais restrito que os lipídios. Tal fato ocorre devido ao maior tamanho das proteínas e também porque muitas proteínas estão associadas a lipídios da bicamada, ao citoesqueleto, a proteínas de outras células, ou ainda, a elementos da matriz extracelular. Desta forma, além de possuírem distribuição assimétrica entre as camadas da bicamada lipídica, as proteínas também podem se localizar em extremidades distintas da célula. Nestes casos, vale ressaltar que a presença de alguns tipos de proteínas apenas em um dos polos da célula, ou em uma das faces da bicamada é, muitas vezes, crucial para o desempenho de sua função e para a fisiologia da célula (exemplificado mais à frente no tópico transporte ativo secundário). Algumas proteínas localizam-se na periferia da membrana (mais frequentemente na face extracelular), sendo ricas em aminoácidos hidrofílicos, e também nas superfícies expostas ao meio aquoso citoplasmático ou citosólico. Estas proteínas são chamadas de periféricas e encontram-se presas a proteínas integrais ou fosfolipídios da membrana através de ligações fracas, facilmente desfeitas pelo tratamento com soluções salinas.

Por outro lado, a ligação das demais proteínas de membrana exige tratamentos mais fortes para que sejam extraídas da membrana, com o uso de detergentes, calor e alguns solventes. Neste caso, as proteínas integrais transmembrana atravessam totalmente a bicamada lipídica da membrana uma vez (monopasso) ou mais vezes, formando alças expostas em uma das faces da membrana (multipasso) (DE ROBERTS, 2006 apud BARBOSA, 2017).

BIOLOGIA CELULAR

Já as proteínas integrais parciais ficam expostas somente em uma das faces da membrana e atravessam apenas uma das camadas da membrana e as proteínas de ancoragem ligam-se na membrana geralmente por ligações covalentes a ácidos graxos de lipídeos na face citosólica ou ao fosfatidilinositol na face extracelular, mas não atravessam a membrana, localizando-se na periferia da membrana.

A forma com que cada tipo de proteína se acomoda na membrana é fundamental para o desempenho de sua função como receptores de sinais, transportadoras de moléculas e íons para dentro ou fora da célula, elementos do sistema de adesão entre as células e com elementos da matriz extracelular, ligação da membrana com elementos do citoesqueleto (como os filamentos de actina e microtúbulos), elementos do sistema de reconhecimento celular, elementos das cadeias transportadoras de elétrons, dentre outras funções desempenhadas pelas proteínas de membrana.

6.3 Principais funções da membrana

Adesão celular

As membranas citoplasmáticas de inúmeras células participam do mecanismo de ligação da célula com outra célula ou com elementos da matriz extracelular, através de diferentes tipos de proteínas de membrana, como as caderinas, lectinas, ocludinas, claudinas, conexinas, dentre outras. Esses mecanismos de ligação permitem não somente manter as células unidas entre elas e com a matriz extracelular, impermeabilizando ou dando sustentação e resistência mecânica ao tecido, como também promovem meios de comunicação e troca de elementos entre as células.

Reconhecimento celular

A participação da membrana no sistema de reconhecimento celular ocorre principalmente devido à presença de glicoproteínas e glicolipídios de membrana, as quais permitem a identificação de células diferentes do mesmo organismo, inclusive células cancerígenas, ou a identificação de células de indivíduos da mesma espécie ou de outra espécie.

BIOLOGIA CELULAR

Quando dois meios entram em contato, os solutos tendem a passar, por difusão, do meio em que estão mais concentrados (meio hipertônico) para o meio em que estão menos concentrados (meio hipotônico), até que os meios atinjam o equilíbrio e apresentem a mesma concentração (meios isotônicos). Nesse contexto, a permeabilidade seletiva é uma das características mais importantes da membrana celular, que funciona como uma barreira semipermeável, na qual apenas um pequeno grupo de moléculas é capaz de atravessar a membrana diretamente, atravessando a bicamada lipídica sem o auxílio de proteínas transportadoras ou de um sistema de formação e fusão de vesículas que ocorre durante a endocitose ou exocitose (JUNQUEIRA, 2013 apud BORGES, 2018).

Nesse contexto, dependendo do gradiente eletroquímico, os íons e moléculas atravessam a membrana, a favor desse gradiente por meio de transporte passivo (sem gasto de energia) ou contra este gradiente, via transporte ativo (com gasto de energia, geralmente derivado da quebra da molécula de ATP). O transporte passivo envolve mecanismos de difusão com a ajuda de moléculas carreadoras (difusão facilitada) ou sem ajuda, diretamente através da membrana (difusão simples), em uma velocidade proporcional ao gradiente eletroquímico. Já o transporte ativo sempre envolve a participação de moléculas carreadoras e gasto de energia para que os solutos possam se deslocar para o meio mais concentrado, ou seja, contra o gradiente eletroquímico.

Transporte passivo sem ajuda de proteínas carreadoras

O transporte passivo de moléculas através da membrana, a favor de um gradiente e sem auxílio de carreadores, é chamado de difusão simples. Em geral, moléculas pequenas e hidrofóbicas (não polares) são transportadas desta forma, embora algumas poucas pequenas moléculas polares não carregadas, como o glicerol e a ureia, sejam capazes de atravessar a bicamada. A água também pode atravessar a membrana diretamente, como solvente devido ao fenômeno de osmose, como discutido previamente.

A plasmólise é caracterizada pela retração do volume das células devido à perda de água por osmose, quando a célula é exposta a um meio exterior mais concentrado (hipertônico). No caso de hemácias, este processo é conhecido como crenação, ocorrendo danos irreversíveis à célula, que podem levá-la à morte. Por outro lado, a turgência é caracterizada pelo aumento do volume devido à entrada de água na célula, através de osmose, quando a célula é exposta a um meio exterior é menos concentrado (hipotônico) que o seu citoplasma (DE ROBERTIS, 2006).

BIOLOGIA CELULAR

No caso de hemácias, este processo é denominado hemólise, devido ao rompimento de hemácias em resposta à entrada excessiva de água. Vale ressaltar que, na célula vegetal, podemos perceber que a célula permanece intacta, devido à proteção da parede celular, e que a mesma pode sofrer um processo de deplasmólise, se a célula for novamente exposta a um meio hipotônico ou isotônico. No entanto, vale frisar que, embora seja possível à água passar através da bicamada lipídica da membrana impulsionada por osmose, a passagem de grandes quantidades de água pela membrana envolve carreadores específicos, chamados aquaporinas. O sistema de regulação desse transporte não envolve o controle da abertura desses transportadores (estando sempre abertos para a passagem de água) e, sim, o controle do número de aquaporinas presente na membrana da célula.

Transporte passivo com a ajuda de proteínas carreadoras

Os íons e moléculas grandes e polares não conseguem atravessar a região hidrofóbica da membrana e, assim, necessitam de proteínas transportadoras (integrais transmembrana) para facilitar seu transporte, ou são transportados por exocitose ou endocitose. O transporte dessas moléculas e íons através da membrana pode ocorrer a favor de um gradiente eletroquímico, sendo chamado de transporte passivo por difusão facilitada. Neste caso, não há gasto de energia e as proteínas transportadoras são classificadas como permeases (transportadores ou carreadores) ou como canais iônicos.

As permeases são específicas para os solutos que transportam e após interagir com estes, mudam sua conformação liberando-os no meio, em contato com a outra face da membrana, voltando à forma original após o transporte do soluto, sem alterar sua composição. Neste processo, estes transportadores não formam canais. Por outro lado, os canais iônicos apresentam-se como poros/canais polares (hidrofílicos), formados por 4 a 5 proteínas integrais transmembrana, geralmente multipassos, por onde íons específicos são capazes de atravessar e atingir o outro lado da membrana, a favor de um gradiente eletroquímico.

A passagem desses íons pela membrana pode ser regulada, uma vez que a maioria desses canais podem se conservar fechados até que surjam estímulos específicos para sua abertura. A abertura de alguns canais é regulada por modificação

BIOLOGIA CELULAR

no potencial de membrana (em canais iônicos dependentes de voltagem), ligação de moléculas (em canais iônicos dependentes de ligante) ou até por contato mecânico (em canais iônicos dependentes de contato). Após a abertura, esses canais permanecem abertos por milésimos de segundos, permitindo a passagem dos íons específicos neste intervalo, quando se fecham e tornam-se inativos por um período de tempo (período refratário), mesmo na presença de estímulo. Este período refratário permite controlar a atividade do canal, impedindo que um mesmo estímulo se propague indefinidamente. Vale dizer, também, que no caso de alguns canais dependentes de ligante, o ligante pode se ligar na superfície externa do canal, enquanto em outros, a ligação ocorre na superfície voltada para o citosol.

Transporte ativo com ajuda de proteínas carreadoras

Transporte ativo primário O transporte ativo primário é essencial para a manutenção de diversos tipos de gradientes eletroquímicos na célula e em suas organelas, importantíssimos para a fisiologia celular. O transporte simultâneo de dois íons de potássio para dentro da célula e três íons de sódio para fora da célula, através da bomba de sódio potássio ATPase ou $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$, é o exemplo mais conhecido deste tipo de transporte ativo primário. Vale mencionar que este transporte é necessariamente acoplado e que, como consequência, a concentração de K^+ é 30 vezes maior dentro da célula que no meio extracelular, enquanto a concentração de Na^+ é 10-30 vezes maior no meio extracelular do que dentro da célula. Essas diferenças são essenciais para a manutenção do potencial elétrico da membrana (por se tratar de bomba eletrogênica) e para o controle de diversas atividades celulares associadas.

Transporte ativo secundário

Um exemplo claro de transporte ativo secundário ocorre nas células do intestino delgado, durante a absorção de glicose na superfície apical da célula (face da célula exposta à luz do intestino). Uma permease específica promove a passagem simultânea de glicose e Na^+ do meio extracelular para o interior da célula. Neste caso, como existe um gradiente favorecendo a passagem do Na^+ para o citoplasma, não há

BIOLOGIA CELULAR

gasto direto de energia. Contudo, para manter este gradiente de Na^+ é necessário promover a saída do sódio novamente para o meio extracelular, contra um gradiente de concentração, veiculado pela bomba de sódio potássio ATPase e envolvendo gasto de energia. Portanto, este tipo de transporte, apesar de não envolver gasto de energia de uma forma direta, depende da atividade em paralelo de um transportador ativo, sendo, então, denominado transporte ativo secundário. Do mesmo modo, após a glicose entrar na célula, ela pode ser transportada passivamente por uma permease para o meio extracelular em contato com a superfície basal da célula (DE ROBERTIS, 2006).

Transporte ativo através da membrana via sistema ABC As proteínas transportadoras ativas ABC (sigla derivado do nome em inglês ATP-binding cassette), encontradas na membrana citoplasmática e de organelas de inúmeras células, desempenham a atividade de ATPase, e assim, fornecem energia para o transporte de alguns solutos contra um gradiente de concentração. Muitos desses transportadores são responsáveis pela eliminação de substâncias tóxicas derivadas do metabolismo da célula. Contudo, alguns desses transportadores, denominados MDR (sigla derivada do inglês multidrug resistance) são encontrados em grande número na membrana de células tumorais, atuando no transporte de drogas citotóxicas (usadas na terapia anticâncer) para fora da célula cancerígena, e consequentemente inviabilizando sua ação e a eficácia do tratamento quimioterápico.

Outro tipo de transportador de membrana de grande importância são os translocons ou canais de translocação. Estes transportadores, presentes na membrana do retículo endoplasmático, estão envolvidos na translocação do peptídeo nascente através da membrana do retículo endoplasmático, durante a síntese de proteínas (JUNQUEIRA, 2013 apud BORGES, 2018).

Existem, também, as porinas, proteínas transportadoras pouco específicas, encontradas na membrana externa de mitocôndrias e algumas bactérias, responsáveis pela passagem de íons e pequenas moléculas. Finalmente, um sistema bastante complexo de transporte através da membrana é representado pelos poros nucleares, responsáveis pelo trânsito entre o núcleo e o citoplasma de enzimas, de subunidades ribossômicas e de fatores de transcrição, dentre outros.

Outro mecanismo de transporte para o interior ou para o exterior da célula, assim como entre diferentes compartimentos celulares, envolve a formação de vesículas. Essas vesículas podem conter íons ou moléculas solúveis, assim como

BIOLOGIA CELULAR

moléculas presas às suas membranas. Desta forma, quando essas vesículas se fundem com a membrana do compartimento ou da organela “destino” ou “alvo”, os íons ou as moléculas solúveis passam para o interior da mesma ou são secretadas para o exterior da célula (no caso de fusão com a membrana citoplasmática), enquanto as moléculas da membrana da vesícula passam a fazer parte da membrana do compartimento ou da organela “destino” ou “alvo”. Também, através da formação de vesículas, a célula é capaz de englobar partículas, células mortas, pedaços de tecidos e patógenos para serem digeridos.

Endocitose

O mecanismo de endocitose envolve o englobamento de solutos, moléculas, partículas, pedaços de tecido, células cancerígenas, células mortas ou micro-organismos através da membrana citoplasmática da célula, seguido por formação de vesícula no interior da célula e digestão do elemento englobado por enzimas presentes nos lisossomos. Assim, este processo pode ser classificado em pinocitose ou fagocitose, dependendo do tipo de elemento englobado (JUNQUEIRA, 2013).

Pinocitose

A pinocitose é um processo de endocitose de líquido e solutos dispersos. Durante este processo, a célula forma uma vesícula chamada pinossomo, que pode se fundir com o endossoma primário, a qual forma novas vesículas que se fundem com o endossoma secundário (que possui enzimas digestivas), acompanhado da redução do pH para formar o lisossomo, onde os solutos podem ser digeridos. A pinocitose pode ainda ser classificada em pinocitose inespecífica, onde a célula executa a pinocitose de elementos inespecíficos que estão no meio extracelular, sem necessidade da presença de um ligante (sinal). Algumas vezes a pinocitose acontece de maneira específica, sendo chamada de pinocitose regulada, uma vez que depende da ligação de um ligante (muitas vezes do próprio elemento a ser pinocitado) no receptor da membrana. Esta é característica de apenas alguns tipos celulares.

BIOLOGIA CELULAR

Fagocitose

Fenômeno em que a célula engloba partículas, pedaços de tecido, células mortas, células cancerígenas ou micro-organismos. A fagocitose tem início com o englobamento do elemento do meio extracelular e a formação de uma grande vesícula denominada fagossomo. Posteriormente, o fagossomo se funde com o endossoma secundário, acompanhado de redução do pH interno, formando o lisossoma, onde o material englobado é digerido pelas enzimas lisossomais. Vale mencionar que a fagocitose é fundamental para diversos mecanismos do sistema de defesa do organismo contra inúmeros patógenos.

Exocitose

O processo de exocitose permite que a célula possa excretar grandes quantidades de produtos metabólicos provenientes do processo de digestão celular, bem como secretar para o meio extracelular compostos sintetizados no interior da célula. Este último processo envolve a formação de vesículas no complexo de Golgi que, ao se fundirem com a membrana, liberam as moléculas encontradas no seu interior para o meio extracelular (JUNQUEIRA, 2013 apud BORGES, 2018).

6.4 Especializações da membrana

A membrana celular dos muitos tipos diferentes de células apresentam estruturas especializadas que permitem o desempenho de atividades específicas. Dentre elas, podemos destacar:

Especializações relacionadas ao aumento da área de superfície

- Microvilosidades (microvilos): prolongamentos da membrana citoplasmática, encontrados em células do epitélio do intestino delgado e epitélio renal, que promovem aumento da superfície de absorção destas células;
- Estereocílios: prolongamentos da superfície celular, encontrados em células epiteliais do epidídimo e ductos do aparelho genital masculino e pavilhão auditivo. Estas estruturas também aumentam a superfície de absorção das células, facilitando o transporte de água e moléculas, mas são diferentes dos microvilos porque são frequentemente ramificados e de maior comprimento.

BIOLOGIA CELULAR

Especializações relacionadas ao movimento celular

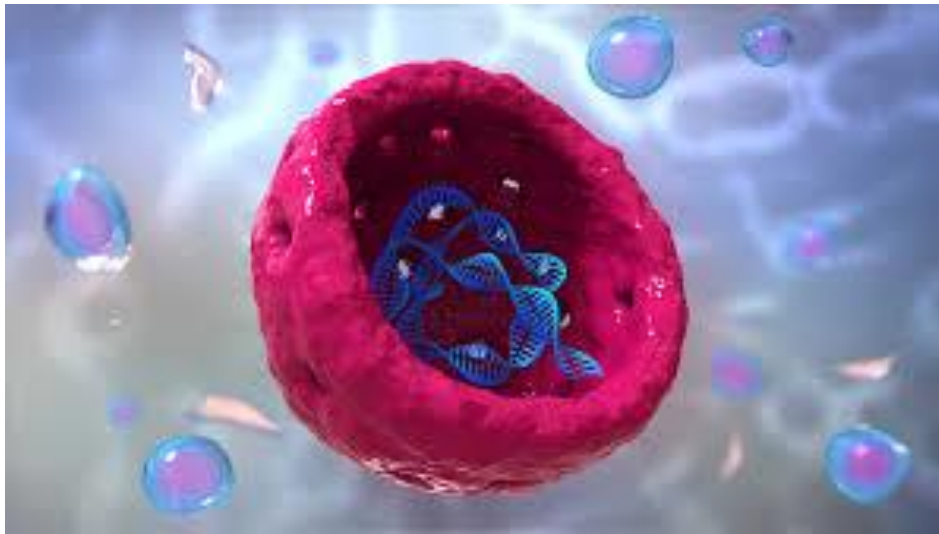
- Flagelo: projeções móveis da membrana plasmática que ocorrem nos espermatozoides, protozoários (como a leishmânia), algas unicelulares (como a euglena) e alguns procariontes, permitindo seu movimento.
- Cílios: projeções móveis semelhantes a pelos, com um diâmetro de 0,2 µm e comprimento de 7 a 10 µm, encontrados na membrana plasmática de algumas células epiteliais, como células do epitélio respiratório e dos ovidutos e em protozoários ciliados. Estas estruturas se diferenciam de flagelos por terem menor tamanho e, geralmente, se apresentar em maior número. Além disso, são importantes não apenas para o movimento de algumas células, como também são especializados em propulsão de muco e de outras substâncias pela superfície celular, através de rápidas oscilações rítmicas.

Outras especializações

Existem diversas especializações que podem estar relacionadas à adesão entre células, entre células e a matriz extracelular, bem como à comunicação celular, exemplificadas abaixo: Adesão entre as células e ancoragem com lâmina basal
Junção aderente (cinturão de adesão) — une as células firmemente; Desmossomas — une as células firmemente; Hemidesmossomas — une as células com a matriz; Contato focal — une as células com a matriz. Vedação (oclusão entre as células)
Junção ou zônula de oclusão (compacta) — une as células, impermeabilizando o tecido. Comunicação entre as células Junção GAP ou Comunicante (“nexus”): permite a comunicação entre as células.

BIOLOGIA CELULAR

7 NÚCLEO E CROMOSSOMOS - SÁ, 2014



Fonte: conhecimentocientifico.r7.com

O núcleo é um compartimento intracelular que abriga os cromossomos, juntamente com a maquinaria necessária para a replicação do DNA e a transcrição e processamento dos RNA's. A presença desta organela constitui a principal diferença entre eucariotos e procariotos.

O DNA em procariotos se encontra no citoplasma sem a delimitação de uma membrana. Este fato exerce uma profunda influência sobre a fisiologia destas células. Os processos de transcrição e tradução ocorrem de forma concomitante, com o RNA mensageiro nascente se associando aos ribossomos, mesmo antes de estar completamente transcrito a partir do molde de DNA.

Em eucariotos, os mesmos processos vistos nos procariotos são separados pela presença do envoltório nuclear, e os RNA's mensageiros são traduzidos apenas após serem completamente transcritos, processados e direcionados ao citoplasma (DE ROBERTS, 2006 apud BARBOSA, 2017).

O núcleo geralmente é esférico e localizado no centro da célula, entretanto, em algumas células, ele pode apresentar a forma de fuso a ovalado, encurvado, lobado ou até a forma de disco. Apesar de normalmente as células eucariotas apresentarem um núcleo único, alguns tipos de células não possuem núcleos, enquanto outras possuem vários núcleos (células polinucleadas). O tamanho, a forma e o aspecto do

BIOLOGIA CELULAR

núcleo geralmente são constantes para um determinado tipo de célula, fato importante para o diagnóstico clínico de certas células cancerosas.

7.1 Organização geral

As células eucariotas mantêm seus DNA's em um compartimento interno separado, o núcleo, o qual mantém contato com o citoplasma através de poros presentes no seu envoltório, também denominado envelope nuclear. O surgimento da microscopia eletrônica permitiu a visualização do núcleo e de seu envoltório em maiores detalhes e a consequente descoberta de que o mesmo é composto por duas membranas concêntricas (membrana externa e membrana interna) uniformemente distanciadas uma da outra pelo espaço perinuclear. A membrana externa é contínua ao retículo endoplasmático, enquanto a membrana interna é associada a uma malha de proteínas denominada lâmina nuclear, um tipo de filamento intermediário que dá sustentação ao envelope. O interior do núcleo é chamado de nucleoplasma. Nele, se encontra a cromatina ou cromossomos, a qual também se associa ao envelope nuclear e a uma matriz nuclear interna.

7.2 Estrutura do envelope

Por ser contínua com o retículo endoplasmático, a membrana externa do envoltório compartilha muitas de suas características. Nela, também observamos a presença de ribossomos associados e de canais de translocação de proteínas. Desta forma, as proteínas sintetizadas, nesses ribossomos, são transferidas para o espaço perinuclear, que é contínuo com o lúmen do retículo endoplasmático. É de se esperar, portanto, que a membrana externa apresente algumas funções relacionadas ao retículo endoplasmático. Esta ideia é reforçada pela observação de que o espaço perinuclear acompanha as modificações sofridas pela luz do retículo endoplasmático durante determinadas situações.

A membrana interna apresenta uma série de proteínas integrais cuja função consiste em mediar a sua associação com a lâmina nuclear e com a cromatina, além da presença de diversas enzimas, tais como aquelas relacionadas ao metabolismo nuclear do fosfatidilinositol e à biossíntese do colesterol.

BIOLOGIA CELULAR

A lâmina nuclear corresponde a uma rede fibrosa de espessura variável, justaposta à membrana interna e que, além de auxiliar na manutenção da forma, fornece estabilidade mecânica ao núcleo. Esta rede fibrosa é composta por um grupo de proteínas relacionadas, chamadas de lâminas, que são encontradas apenas no reino animal (DE ROBERTS, 2006 apud BARBOSA, 2017).

Estas proteínas pertencem ao grupo das proteínas dos filamentos intermediários do citoesqueleto.

A maioria das células de mamíferos contém quatro lâminas diferentes, designadas A, B1, B2 e C. Todas são proteínas fibrosas variando de 60 a 80 KDa, que se associam umas às outras para formarem um filamento. Além de se ligarem às proteínas integrais específicas da membrana nuclear interna e aos complexos de poro nuclear, a associação das lâminas com a membrana nuclear é facilitada pela adição pós-traducional de grupos lipídicos ligados covalentemente, em particular, pela prenilação de resíduos de cisteína da extremidade c-terminal. A lâmina nuclear também está indiretamente conectada aos filamentos citoplasmáticos do citoesqueleto através de proteínas presentes na membrana nuclear interna e externa, que interagem entre si formando um complexo denominado de LINC (ligador do nucleoesqueleto com o citoesqueleto). Além de permitir que as forças geradas no citoplasma sejam transmitidas para a lâmina nuclear, o complexo LINC é determinante na manutenção da forma e no posicionamento do núcleo dentro da célula.

Uma matriz de lâminas nucleares, com organização mais frouxa, projeta-se para o interior do núcleo. Essas lâminas servem como sítios de adesão da cromatina, em especial da cromatina condensada, além de reguladores da transcrição e complexos de remodelamento da cromatina. É de se esperar, portanto, que a organização normal das lâminas seja essencial para os processos de regulação da transcrição assim como para a replicação do DNA. A superfície do envoltório nuclear é marcada pela presença de poros nucleares que, devido à complexidade estrutural e funcional são denominados de complexos de poro. Na região de inserção dos complexos de poro, as membranas, externa e interna, estão unidas, apesar disso as duas membranas mantêm composições proteicas distintas. Assim como as demais membranas celulares, cada membrana nuclear é formada por uma bicamada de fosfolipídios, sendo permeáveis somente para pequenas moléculas hidrofóbicas, as demais moléculas são incapazes de se difundirem através dessas bicamadas. Os complexos de poro são os únicos canais existentes, no envelope nuclear, e é através

deles que íons, pequenas moléculas polares e macromoléculas entram e saem do núcleo.

7.3 Complexos de poro

Os complexos de poro nuclear são estruturas grandes e elaboradas que atravessam o envoltório nuclear de todos os eucariotos. Em células animais, cada complexo de poro nuclear tem uma massa molecular estimada em torno de 125 milhões de daltons, aproximadamente 30X o tamanho de um ribossomo, e é composto por cerca de 30 proteínas diferentes, conhecidas como nucleoporinas, que estão presentes em múltiplas cópias e organizadas em um arranjo que apresenta simetria octogonal.

O número e a densidade dos complexos de poro são bastante variáveis e provavelmente relacionados à necessidade da célula em realizar transportes entre o núcleo e o citoplasma. Enquanto oócitos, por exemplo, são extremamente ricos em complexos de poro, os espermatozoides são desprovidos dele (JUNQUEIRA, 2013 apud BARRETO, 2014).

Entretanto, o envelope nuclear de uma célula de mamífero típica apresenta, em média, de 3 a 4 mil complexos de poro nuclear, os quais exercem um papel fundamental na fisiologia de todas as células eucariotas, pois, enquanto os RNAs sintetizados no núcleo devem ser direcionados para o citoplasma para que atuem na síntese proteica, muitas proteínas que exercem suas funções dentro do núcleo, tais como as histonas e as laminas, devem ser importadas do citoplasma, onde são sintetizadas, para o núcleo. Além disso, muitas proteínas circulam continuamente entre o núcleo e o citoplasma, de forma que há uma contínua movimentação de proteínas e RNA's pelos complexos de poro nuclear e, embora não se saiba ainda como ocorre o controle do fluxo bidirecional, cada um deles pode transportar até 500 macromoléculas por segundo em ambas as direções. Cada complexo de poro contém além de um canal central, oito canais periféricos de 5 a 10 nm de diâmetro, preenchidos por água, que facilitam a passagem de íons e pequenas moléculas. O canal central, também preenchido por água, permite a passagem de complexos maiores. Sendo assim, dependendo do tamanho das moléculas, estas podem deslocar-se através dos poros por um de dois caminhos diferentes.

BIOLOGIA CELULAR

Moléculas pequenas e algumas proteínas com massa molecular menor do que aproximadamente 40KDa (ou 5nm) passam livremente através do envelope nuclear em ambas as direções: citoplasma-núcleo e núcleo-citoplasma. Essas moléculas difundem-se passivamente através dos canais aquosos (JUNQUEIRA, 2013 apud BARBOSA, 2017).

A velocidade da difusão, entretanto, varia conforme o tamanho, quanto maior a molécula menor a velocidade de difusão. Isto porque muitas das proteínas que revestem o canal central contêm regiões extensivas, as quais parecem formar uma trança desordenada, semelhante a um emaranhado, que preenche o centro do canal, o que dificulta a passagem de moléculas grandes.

Desta forma, a maioria das proteínas e RNA's são incapazes de passar através desses canais abertos. Essas macromoléculas e complexos macromoleculares (como os ribossomos) devem apresentar um sinal de distribuição apropriado, o qual é reconhecido e utilizado para a transferência dessas macromoléculas através dos complexos de poro em uma direção específica.

7.4 Organização interna do núcleo

O núcleo não é apenas um compartimento onde a cromatina está armazenada, ele apresenta uma estrutura interna que organiza o material genético e localiza algumas funções nucleares em sítios distintos ou domínios. A maioria destes domínios, senão todos, parece estar baseada na estrutura altamente organizada e no posicionamento da cromatina dentro do núcleo. Dentro do núcleo, cada cromossomo, mesmo durante a intérfase, ocupa uma região distinta, de maneira que os vários cromossomos não se enroscam uns nos outros. Além disso, regiões específicas de cada cromossomo se associam ao envelope ou à lâmina nuclear, criando, desta forma, domínios funcionais distintos, que apresentam um papel importante na regulação da expressão gênica. As regiões de heterocromatina, que não apresentam genes ativos, estão associadas à lâmina nuclear, enquanto as regiões de eucromatina, que apresentam os genes que estão ativos, ficam voltadas para o interior do núcleo.

A organização interna do núcleo também é demonstrada pela localização de outros processos nucleares em regiões específicas do núcleo ou corpos nucleares. Estas regiões se caracterizam por serem enriquecidas em proteínas e/ou RNAs específicos e podem estar envolvidas em uma série de atividades nucleares, incluindo regulação gênica, processamento de diferentes tipos de

BIOLOGIA CELULAR

RNAs, proteólise e replicação do DNA ((DE ROBERTS, 2006 apud BARRETO, 2014).

Alguns destes corpos já foram visualizados e vêm sendo estudados, tais como os corpos de Cajal e os grânulos de intercromatina (também chamadas de speckles ou manchas). Além de serem estruturas extremamente dinâmicas, nenhum desses corpos é envolvido por membrana.

Nucléolo

Os nucléolos são corpúsculos em geral esféricos, geralmente visíveis nas células vivas, examinadas ao microscópio sem qualquer coloração. Os nucléolos contêm grande quantidade de ácido ribonucleico (RNA) e de proteínas básicas, ao lado de pequena quantidade de DNA. Geralmente, os nucléolos são basófilos em razão do RNA, que se cora por corantes básicos; contudo, os que apresentam elevado teor de proteínas básicas, que têm afinidade pelos corantes ácidos, são acidófilos (JUNQUEIRA, 2013).

Nucléolo e Síntese de ribossomos

Os ribossomos dos eucariotos superiores contêm quatro tipos de RNAs, 5S, 5.8S, 18S e 28S, que são chamados de RNAs ribossomais (rRNA). Os RNAs 5S, 28S e 5.8S associados a aproximadamente quarenta e nove proteínas, formam a subunidade maior (60S) enquanto o RNA 18S associado com aproximadamente trinta e três proteínas forma a subunidade menor (40S). Os RNAs 5.8S, 18S e 28S são transcritos no nucléolo, enquanto o RNA 5S é transcrito fora do nucléolo e depois encaminhado para ele.

Para atender a necessidade de produção de um grande número de ribossomos, todas as células contêm múltiplas cópias dos genes que codificam os RNAs ribossomais.

Durante a interfase, os pares de cromossomos 13, 14, 15, 21 e 22, estendem alças de DNA (contendo os genes ribossomais) para o nucléolo onde ocorrerá a transcrição dos genes ribossomais. Tais regiões destes cromossomos são chamadas de organizadoras de nucléolo. Os RNAs ribossomais, 5.8S, 18S e 28S, são transcritos

BIOLOGIA CELULAR

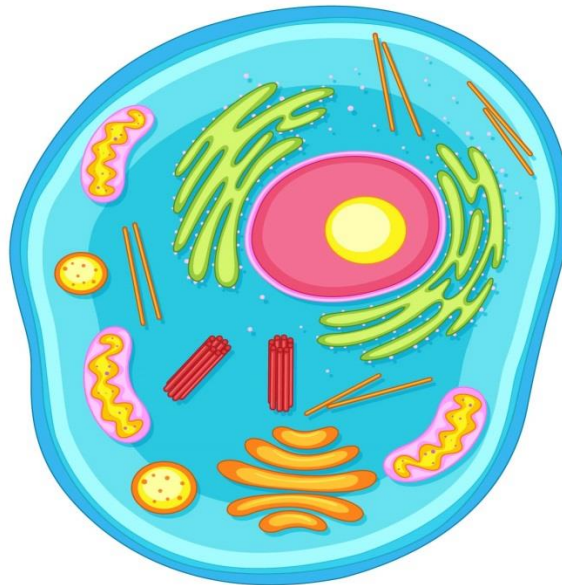
como uma unidade única, produzindo um RNA precursor 45S, denominado pré-rRNA 45S, que contém os RNAs ribossomais 18S, 5.8S e 28S, bem como regiões espaçadoras transcritas. Este precursor sofre modificações químicas em alguns de seus nucleotídeos, como metilações e isomerizações, sendo clivado para a formação dos RNAs 18S, 5.8S e 28S.

A formação dos ribossomos envolve a união destes RNAs ribossomais, com proteínas ribossomais e com o rRNA 5S. As proteínas ribossomais são codificadas por genes que são transcritos fora do nucléolo. Tais proteínas são transportadas do citoplasma (onde são traduzidas) para o nucléolo, onde são unidas com os RNAs ribossomais para a formação das partículas pré-ribossomais. Os rRNAs 5S, embora sejam transcritos fora do nucléolo, também se unem às partículas pré-ribossomais dentro do nucléolo. Mais da metade das proteínas ribossomais se associa com o pré-rRNA 45S antes da sua clivagem se iniciar e as proteínas restantes, assim como o rRNA 5S, são incorporadas às partículas pré-ribossomais conforme a clivagem prossegue. Em seguida, as partículas pré-ribossomais são exportadas para o citoplasma, onde ocorrem os estágios finais da maturação ribossomal, formando-se assim, as subunidades maior (60S) e menor (40S) ativas de ribossomos eucariotos.

Acredita-se que estas regiões representem os sítios de estágios progressivos da transcrição, processamento dos RNAs e montagem dos ribossomos, com a transcrição ocorrendo entre o centro fibrilar e o componente fibrilar denso e o processamento dos RNAs e a montagem dos ribossomos ocorrendo nos componentes granulares adjacentes.

BIOLOGIA CELULAR

8 COMPONENTES CITOPLASMATICOS



Fonte: stoodi.com

Núcleo, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, ribossomos, endossomos, lisossomos, peroxissomos, mitocôndrias são as organelas celulares que desempenham diversos papéis. Inicialmente serão mencionadas as principais funções de cada uma delas para, em seguida, abordar os mecanismos de síntese e distribuição das proteínas destinadas ao citoplasma, para as organelas e para o meio externo.

Principais Funções Núcleo

Está presente em células eucarióticas. É delimitado pelo envelope nuclear composto por duas membranas concêntricas revestidas internamente por lâminas nucleares (um tipo de filamento intermediário) que conferem forma e resistência ao núcleo.

Retículo Endoplasmático

No citoplasma das células eucariontes existe uma rede de vesículas achatadas, vesículas esféricas e túbulos que se intercomunicam, formando um sistema contínuo,

BIOLOGIA CELULAR

embora apareçam separados nos cortes examinados no microscópio eletrônico. Esses elementos apresentam uma parede formada por uma unidade de membrana que delimita cavidades, as cisternas do retículo endoplasmático. As cisternas constituem um sistema de túneis, de forma muito variável, que percorre o citoplasma. Distinguem-se o retículo endoplasmático rugoso, ou granular, e o liso.

A membrana do retículo endoplasmático rugoso apresenta os ribossomos na sua superfície voltada para o citosol. Os ribossomos são partículas densas aos elétrons e constituídas de ácido ribonucleico (RNA ribossômico ou rRNA) e proteínas. Os ribossomos das células eucariontes têm um diâmetro de 15 a 20 nm, sendo um pouco menores nas células procariontes (bactérias). Cada ribossomo é formado por duas subunidades de tamanhos diferentes, que se associam somente quando se ligam aos filamentos de RNA mensageiro (mRNA) (DE ROBERTS, 2006 apud BARBOSA, 2017).

Como diversos ribossomos se associam a um único filamento de RNA mensageiro (mRNA), formam-se polirribossomos, que ficam dispersos no citoplasma ou presos à superfície externa do retículo endoplasmático rugoso. Os polirribossomos têm papel fundamental na síntese de proteínas.

O retículo endoplasmático liso apresenta-se principalmente como túbulos que se anastomosam e se continuam com o retículo rugoso. O retículo endoplasmático liso é muito desenvolvido em determinados tipos de células, como, por exemplo, nas que secretam hormônios esteroides, nas células hepáticas e nas células da glândula adrenal (DE ROBERTIS, 2006).

Ribossomos

São as estruturas responsáveis pela síntese proteica. Cada ribossomo é constituído por uma subunidade maior e outra menor. Ambas são formadas por uma mistura de RNAs ribossomais e proteínas ribossomais. Em eucariotos, a subunidade maior apresenta cerca de 49 proteínas e 3 moléculas de RNAr e a subunidade menor possui em torno de 33 proteínas e 1 RNAr. Os ribossomos de procariotos são bastante semelhantes. Proteínas são fabricadas à medida que o ribossomo percorre a extensão dos RNAm (mensageiro) traduzindo-os.

BIOLOGIA CELULAR

Complexo de Golgi (CG) ou Aparelho de Golgi

Foi inicialmente descrito por Camilo Golgi, em 1898. Está localizado normalmente entre o retículo endoplasmático e a membrana plasmática. É formado por uma unidade polarizada, constituída por uma série de pequenos sacos e compartimentos achatados delimitados por membrana, chamados de cisternas. A face do complexo de Golgi voltada para o retículo endoplasmático é a face cis e a face voltada para a membrana plasmática é a face trans. O CG recebe proteínas e lipídios do retículo endoplasmático através de vesículas transportadoras. No CG essas moléculas sofrem ação de várias enzimas que promovem modificações, tais como: glicosilação (adição de carboidratos), fosforilação (adição de fosfato), sulfatação (adição de enxofre) e proteólise (clivagem por ação enzimática) para, em seguida, serem direcionadas para outros compartimentos celulares ou exportadas para o meio extracelular.

Células com intensa atividade secretória normalmente apresentam complexo de Golgi bastante desenvolvido. Ainda não está bem definido como exatamente ocorre o transporte de proteínas entre os compartimentos do complexo de Golgi. No entanto, existem dois modelos que apontam para uma explicação.

Endossomos

Os endossomos formam um compartimento que recebe as moléculas introduzidas no citoplasma das células pelas vesículas de pinocitose, que se originam da membrana plasmática. O compartimento endossomal é constituído de elementos separados; é um sistema extenso, que se vai desde a periferia do citoplasma até as proximidades do núcleo celular. É formado por vesículas e túbulos, cujo interior apresenta pH ácido. Esse compartimento é responsável pela separação e pelo endereçamento do material que penetra no citoplasma pelas vesículas de pinocitose. Grande parte desse material é encaminhada para os lisossomos; porém, muitas moléculas passam dos endossomos para o citosol, e outras são devolvidas para a superfície celular. Os endossomos podem ser considerados como uma parte da via lisossomal, porque muitas moléculas que se dirigem para os lisossomos passam antes pelos endossomos (DE ROBERTIS, 2006).

BIOLOGIA CELULAR

Lisossomos

São formados a partir de vesículas que se destacaram da rede trans do complexo de Golgi. Estão carregadas de enzimas hidrolíticas ácidas que foram inicialmente produzidas no RER e transferidas para o CG. Constituem o principal local de digestão do material obtido por endocitose (pinocitose e fagocitose) e de reciclagem das macromoléculas que não são mais úteis à célula.

A membrana dos lisossomos possui uma bomba de H^+ (prótons) associada ao consumo de ATP que transfere íons H^+ do citoplasma em direção ao interior do lisossomo, assegurando a manutenção do pH lisossomal em torno de 5,0 (pH ideal para a ativação das enzimas hidrolíticas). Para evitar que a membrana do lisossomo seja alvo de digestão através da ação das suas próprias enzimas hidrolíticas, a face interna da membrana possui glicoproteínas que fornecem um revestimento de açúcares, protegendo a membrana do lisossomo da ação enzimática.

Se mesmo assim, ocorrer algum incidente e a membrana do lisossomo for rompida, os demais compartimentos celulares não são afetados, uma vez que, o pH citosólico está em torno de 7,2, não favorecendo a atividade das enzimas lisossomais (DE ROBERTIS, 2001 apud BARRETO, 2014).

Outro evento que tem a participação dos lisossomos é a autofagia. Quando algum componente envelhecido da célula (uma organela, por exemplo) não executa adequadamente uma função, é prontamente englobado por uma dupla membrana (chamada de autofagossomo) e direcionado para o interior do lisossomo, para ser destruído e os seus nutrientes reciclados.

Mitocôndria

As mitocôndrias são organelas esféricas ou, mais frequentemente, alongadas. Nas micrografias eletrônicas aparecem constituídas por duas unidades de membrana, sendo a interna pregueada, originando dobras em forma de prateleiras ou de túbulos. A principal função das mitocôndrias é liberar energia gradualmente das moléculas de ácidos graxos e glicose, provenientes dos alimentos, produzindo calor e moléculas de ATP (adenosina-trifosfato). A energia armazenada no ATP é usada pelas células para realizar suas diversas atividades, como movimentação, secreção e divisão mitótica.

BIOLOGIA CELULAR

As mitocôndrias participam também de outros processos do metabolismo celular (chama-se metabolismo o conjunto de processos químicos de degradação e síntese de moléculas), muito variáveis conforme o tipo de célula (DE ROBERTIS, 2001).

Como é possível a mitocôndria constituir o principal local de produção de energia na célula? Graças ao processo de fosforilação oxidativa que consiste na fosforilação do ADP (difosfato de adenosina) em ATP (trifosfato de adenosina) a partir de reações de oxidação-redução. Para entender melhor este processo, lembre-se de alguns pontos importantes:

- As reações de oxidação dos nutrientes como carboidratos, lipídios e proteínas convergem para a produção, na mitocôndria, de uma molécula-chave do metabolismo energético, a molécula de acetil-CoA (uma acetila associada à coenzima A);
- Ainda na mitocôndria, as moléculas de acetil-CoA são oxidadas a CO₂ e H₂O no ciclo do Ácido Cítrico (ou Ciclo de Krebs). As reações de oxidação liberam elétrons que são incorporados às coenzimas NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e FAD (flavina adenina dinucleotídeo), reduzindo-as à NADH e FADH₂;
- As moléculas de NADH e FADH₂ serão reoxidadas novamente à NAD⁺ e FAD na cadeia respiratória ou cadeia transportadora de elétrons;
- Diferentemente de outras organelas, a mitocôndria possui DNA próprio.

O DNA mitocondrial apresenta genes que codificam para a síntese de 13 RNAm, 22 RNAt e 2 RNAr. A maioria das 13 proteínas sintetizadas por ribossomos mitocondriais pertencem à cadeia respiratória. Portanto, a maior parte das proteínas mitocondriais é codificada por genes nucleares, produzidas no citoplasma celular e direcionadas, posteriormente, para a mitocôndria (DE ROBERTIS, 2001).

BIOLOGIA CELULAR

9 FERRAMENTAS DA BIOLOGIA CELULAR - COOPER, 2016



Fonte: veja.abril.com

Como em todas as ciências experimentais, a pesquisa em biologia celular depende de técnicas laboratoriais que possam ser usadas para estudar a estrutura e a função celular. Avanços muito importantes na compreensão das células têm sucedido diretamente o desenvolvimento de novas técnicas, que permitiram novos meios de investigação.

O exame das metodologias experimentais disponíveis para a biologia celular é essencial para a compreensão tanto da situação atual como do direcionamento futuro dessa área de avanço rápido da ciência. Algumas das importantes técnicas de uso comum da biologia celular são descritas a seguir.

9.1 Microscopia ótica

A célula é pequena para ser vista a olho nu, o estudo das células depende do uso de microscópios. Na realidade, a descoberta das células resultou do desenvolvimento do microscópio: Robert Hooke inventou o termo “célula” após suas observações de um pedaço de cortiça com um microscópio ótico simples, em 1665. Usando um microscópio que aumentava os objetos cerca de 300 vezes seu tamanho real, Antony van Leeuwenhoek, por volta de 1670, foi capaz de observar uma grande

BIOLOGIA CELULAR

variedade de tipos celulares diferentes, incluindo espermatozoides, glóbulos vermelhos e bactérias.

A proposta da teoria celular por Matthias Schleiden e Theodor Schwann, em 1838, pode ser vista como o nascimento da biologia celular contemporânea. Estudos microscópicos de tecidos de plantas por Schleiden e de tecidos animais por Schwann levaram às mesmas conclusões: todos os organismos são compostos por células. Pouco tempo após, foi reconhecido que as células não são formadas *de novo*, mas originam-se somente por divisão de células preexistentes. Consequentemente, em razão das observações feitas com o microscópio ótico, a célula foi reconhecida como a unidade fundamental de todos os organismos vivos.

O microscópio ótico permanece como um instrumento básico dos biólogos celulares, com aperfeiçoamentos técnicos permitindo a crescente visualização de detalhes da estrutura celular. Os microscópios óticos atuais são capazes de ampliar objetos até mil vezes. Já que a maioria das células tem entre 1 e 100 μm de diâmetro, elas podem ser observadas por microscopia ótica, como também o podem algumas das organelas subcelulares maiores, como núcleo, cloroplastos e mitocôndrias (DE ROBERTS, 2006 apud COOPER, 2016).

Entretanto, o microscópio ótico não é suficientemente poderoso para revelar detalhes finos da estrutura celular, já que a resolução – a habilidade de um microscópio de distinguir objetos separados por distâncias pequenas – é mais importante do que a ampliação. Imagens podem ser ampliadas tanto quanto desejado (por exemplo, por projeção em uma tela grande), mas a ampliação não aumenta o nível dos detalhes que podem ser observados. O limite da resolução do microscópio ótico é de aproximadamente 0,2 μm ; dois objetos separados por uma distância menor que essa aparecem como uma única imagem, em vez de serem distinguidos um do outro. Esse limite teórico da microscopia ótica é determinado por dois fatores – o comprimento de onda (λ) da luz visível e a convergência ótica das lentes microscópicas (abertura numérica, NA) – de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Resolução} = 0,61\lambda/NA$$

O comprimento de onda da luz visível é de 0,4 a 0,7 μm , de modo que o valor de λ é fixado em aproximadamente 0,5 μm para o microscópio ótico. A abertura numérica pode ser considerada como o tamanho do cone de luz que entra nas lentes do

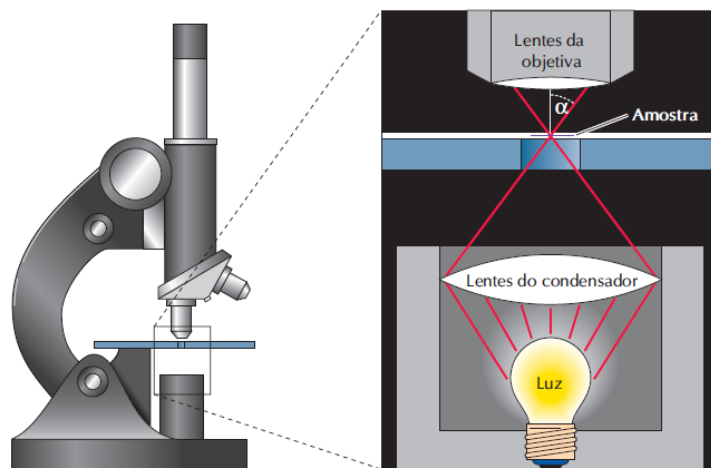
BIOLOGIA CELULAR

microscópio após passar através da amostra. Isto é dado pela equação:

$$NA = n \sin \alpha$$

Onde n é o índice de refração do meio através do qual a luz passa entre a amostra e a lente. O valor de n para o ar é de 1,0, mas pode ser aumentado para um máximo de aproximadamente 1,4 pelo uso de uma lente para óleo de imersão, quando a amostra é vista através de uma gota de óleo. O ângulo α corresponde à metade do comprimento do cone de luz recebido pela lente. O valor máximo de α é 90° , sendo $\sin \alpha = 1$, de modo que o maior valor possível para a abertura numérica é 1,4. Portanto, o limite teórico para a resolução do microscópio ótico pode ser calculado como segue:

$$\text{Resolução} = 0,61 \times 0,5/1,4 = 0,22 \mu\text{m}.$$



Microscópios capazes de atingir esse nível de resolução já podiam ser feitos no fim do século XIX; portanto, aprimoramentos nesse aspecto da microscopia ótica não devem ser esperados.

Vários tipos diferentes de microscopia ótica são rotineiramente usados para o estudo de vários aspectos da estrutura celular. O mais simples é a microscopia de campo claro, no qual a luz passa diretamente através da célula e a capacidade de distinguir diferentes partes da célula depende do contraste resultante da absorção da luz visível pelos componentes celulares. Em muitos casos, células são coradas com corantes que reagem com proteínas e ácidos nucleicos com o objetivo de aumentar o contraste entre as diferentes partes da célula. Antes da coloração, as amostras em geral são tratadas com fixadores (como álcool, ácido acético ou formaldeído) para

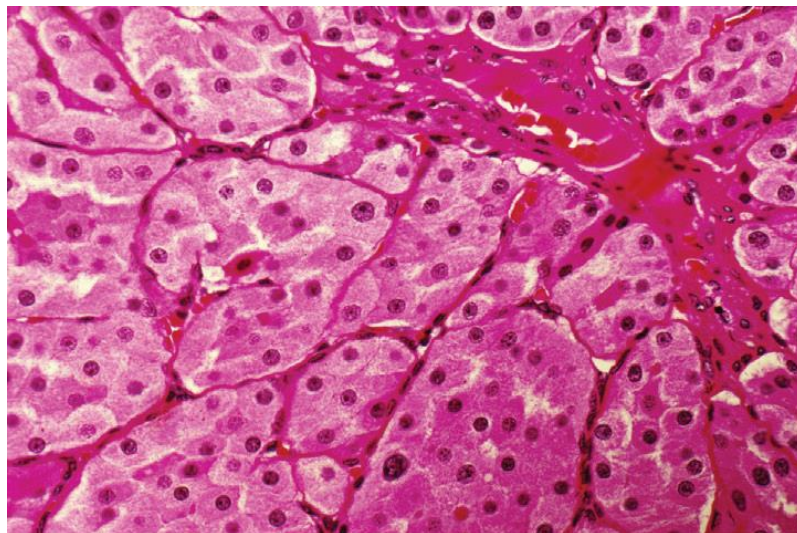
BIOLOGIA CELULAR

estabilizar e preservar suas estruturas. A análise de tecidos fixados e corados pela microscopia de campo claro é o método-padrão para a análise de amostras de tecidos em laboratórios de histologia. Entretanto, esses procedimentos de coloração matam as células e, portanto, não são adequados para muitos experimentos, nos quais a observação de células vivas é desejável.

Sem coloração, a passagem direta da luz não fornece contraste suficiente para distinguir muitas partes da célula, limitando a utilização da microscopia de campo claro.

Entretanto, variações do microscópio ótico podem ser usadas para aumentar o contraste entre as ondas de luz que passam através de regiões da célula de densidades diferentes. (DE ROBERTS, 2006 apud BARBOSA, 2017).

Dois dos métodos mais comuns para visualização de células vivas são a microscopia de contraste de fase e a microscopia de contraste de interferência diferencial. Ambos os tipos de microscopia usam sistemas óticos que convertem variações de densidade ou espessura entre partes diferentes da célula em diferenças no contraste que podem ser vistas na imagem final.



Micrografia de campo claro de tecido corado

Na microscopia de campo claro, estruturas transparentes (como o núcleo) têm pouco contraste porque absorvem pouca luz. Entretanto, a luz tem a velocidade reduzida pela passagem nessas estruturas de tal forma que sua fase é alterada, comparada à luz que passa através do citoplasma que circunda o núcleo. A

BIOLOGIA CELULAR

microscopia de contraste de fase e a de contraste de interferência diferencial convertem essas diferenças na fase para diferenças no contraste, desse modo produzindo melhores imagens de células vivas não-coradas. O poder do microscópio ótico foi consideravelmente expandido pelo uso de câmeras digitais e computadores para análise e processamento das imagens. Os sistemas eletrônicos de análise e processamento de imagens podem melhorar substancialmente o contraste das imagens obtidas com o microscópio ótico, permitindo a visualização de pequenos objetos que de outro modo não seriam detectados. Por exemplo, a microscopia de contraste de interferência diferencial intensificada por vídeo permite a visualização do movimento das organelas através dos microtúbulos, que são filamentos protéicos do citoesqueleto com um diâmetro de apenas 0,025 μm . Entretanto, esta amplificação não ultrapassa o limite teórico da resolução do microscópio ótico, de aproximadamente 0,2 μm . Então, embora o realce pelo vídeo permita a visualização dos microtúbulos, eles aparecem como imagens borradas de pelo menos 0,2 μm de diâmetro e um microtúbulo individual não pode ser distinguido de um feixe de estruturas adjacentes.

A microscopia ótica tem sido usada no nível de análise molecular por métodos de marcação de moléculas específicas, e assim elas podem ser visualizadas no interior das células. Genes ou RNA transcritos específicos podem ser detectados por hibridização com sondas de ácidos nucleicos com sequências complementares, e proteínas podem ser detectadas pelo uso de anticorpos apropriados. Tanto sondas de ácidos nucleicos como anticorpos podem ser marcados com uma variedade de substâncias que permitem sua visualização no microscópio ótico, tornando possível determinar a localização de moléculas específicas dentro de células individuais.

A microscopia de fluorescência é um método muito sensível e amplamente usado para o estudo da distribuição intracelular de moléculas. Um corante fluorescente é usado para marcar a molécula de interesse dentro de células fixadas ou vivas (JUNQUEIRA, 2013 apud COOPER, 2016).

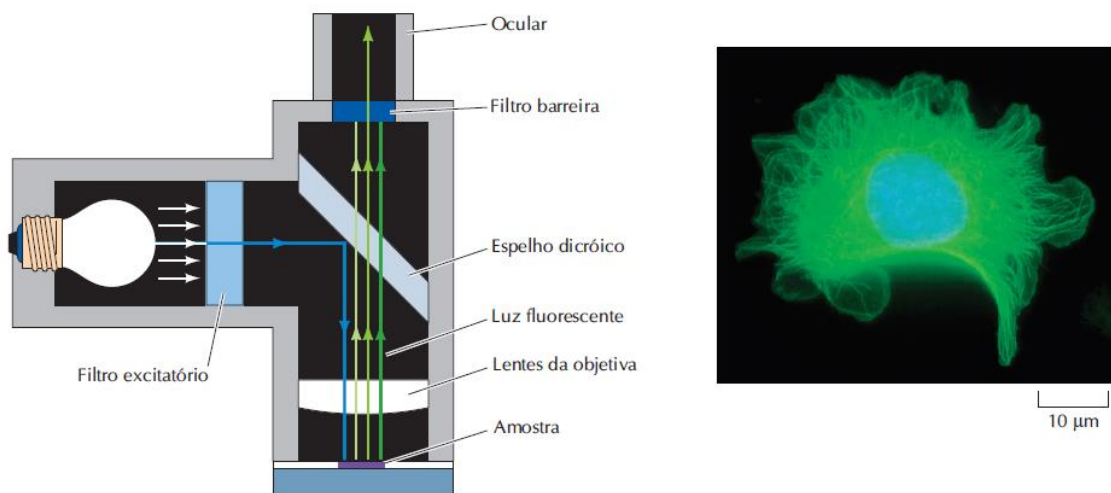
O corante fluorescente é uma molécula que absorve luz em um comprimento de onda e emite luz em um segundo comprimento de onda. Essa fluorescência é detectada pela iluminação da amostra com luz no comprimento de onda que excita o corante fluorescente, seguida do uso de filtros adequados para detectar o comprimento de onda específico que o corante emite. A microscopia de fluorescência pode ser usada para estudar diferentes moléculas dentro das células.

BIOLOGIA CELULAR

Uma aplicação frequente é a marcação direta de anticorpos contra uma proteína específica com corante fluorescente, fazendo com que a distribuição intracelular da proteína possa ser determinada.

Um avanço importante e recente na microscopia de fluorescência foi o uso da proteína fluorescente verde (GFP), do inglês *Green Fluorescent Protein*, de uma medusa para visualizar proteínas dentro de células vivas. A GFP pode ser fusionada a qualquer proteína de interesse, pelo uso de técnicas-padrão de DNA recombinante,

e então a proteína ligada à GFP pode ser introduzida nas células e detectada por microscopia de fluorescência, sem necessidade de fixar e corar a célula, como seria preciso para a detecção de proteínas com anticorpos. Devido à sua versatilidade, o uso de GFP se tornou extremamente difundido em biologia celular e tem sido empregado para acompanhar a localização e os movimentos de uma ampla variedade de proteínas dentro de células vivas.



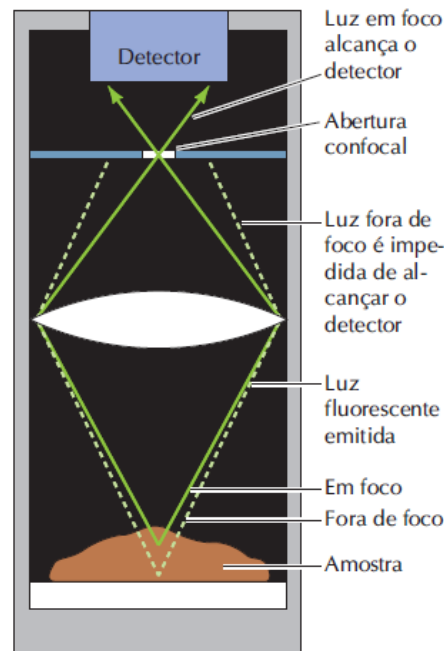
Microscopia fluorescência

A microscopia confocal combina a microscopia de fluorescência com a análise eletrônica de imagens para obter imagens com contraste e detalhes aumentados.

Um pequeno ponto de luz, usualmente emitido por um *laser*, é focado na amostra, em uma profundidade específica. A luz fluorescente emitida é coletada por um detector com uma câmera de vídeo. Entretanto, antes da luz emitida alcançar o detector, ela deve passar através de uma abertura capilar (chamada de abertura confocal) precisamente colocada no ponto onde a luz emitida, a partir da profundidade

BIOLOGIA CELULAR

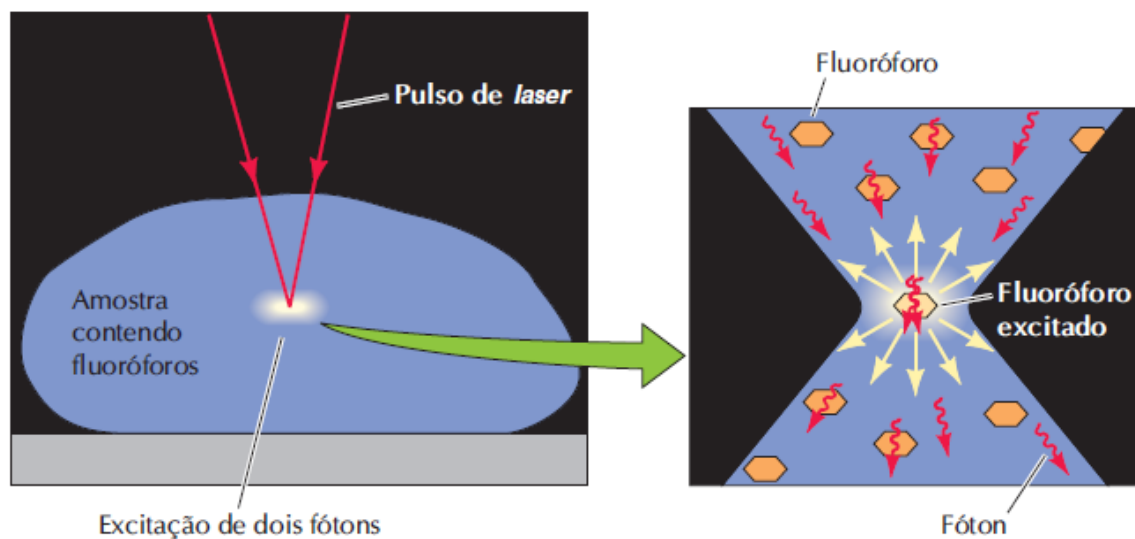
escolhida na amostra, aproxima-se do foco. Consequentemente, somente a luz emitida a partir do plano de foco é capaz de atingir o detector. Uma varredura da amostra gera uma imagem bidimensional do plano de foco, uma imagem muito mais precisa que a obtida com a microscopia de fluorescência padrão. Além do mais, uma série de imagens obtidas de diferentes profundidades pode ser usada para a construção de uma imagem tridimensional da amostra.



Microscopia confocal

A microscopia de excitação multifóton é uma alternativa para a microscopia confocal que pode ser usada em células vivas. A amostra é iluminada com um comprimento de onda de luz que, para excitar o corante fluorescente, necessita da absorção simultânea de dois ou mais fótons. A probabilidade de dois ou mais fótons simultaneamente excitarem o corante fluorescente só é significativa no ponto da amostra acima do qual o feixe do *laser* é focado, de modo que a fluorescência só é emitida a partir do plano de foco da luz emitida. Essa excitação altamente localizada fornece automaticamente uma resolução tridimensional, sem a necessidade da passagem da luz emitida através de uma abertura capilar, como na microscopia confocal. Além do mais, a excitação localizada minimiza os danos à amostra, permitindo imagens tridimensionais de células vivas.

BIOLOGIA CELULAR



Microscopia de excitação de dois fótons

9.2 Microscopia eletrônica

Em razão do limite da resolução do microscópio ótico, a análise de detalhes da estrutura celular requer o uso de técnicas microscópicas mais potentes – por exemplo, a microscopia eletrônica, que foi desenvolvida na década de 1930 e foi usada pela primeira vez para análise de amostras biológicas por Albert Claude, Keith Porter e George Palade durante os anos de 1940 e 1950. O microscópio eletrônico pode alcançar uma resolução muito maior que a obtida pelo microscópio ótico porque o comprimento de ondas dos elétrons é menor do que o da luz. O comprimento de onda dos elétrons em um microscópio eletrônico pode ser tão curto quanto 0,004 nm – cerca de 100.000 vezes menor que o comprimento de onda da luz visível.

Teoricamente, esse comprimento de onda poderia permitir uma resolução de 0,002 nm, mas tal resolução não pode ser obtida na prática, porque a resolução é determinada não somente pelo comprimento de onda, mas também pela abertura numérica das lentes microscópicas. A abertura numérica é um fator limitante para a microscopia eletrônica porque as propriedades inerentes das lentes eletromagnéticas limitam seu ângulo de abertura em cerca de 0,5 grau, correspondente a aberturas numéricas de cerca de 0,01 (DE ROBERTS, 2006 apud BARBOSA, 2017).

Então, sob condições ótimas, a capacidade de resolução do microscópio eletrônico é de aproximadamente 0,2 nm. Além do mais, a resolução que pode ser obtida com amostras biológicas é também limitada pela perda inerente de contraste

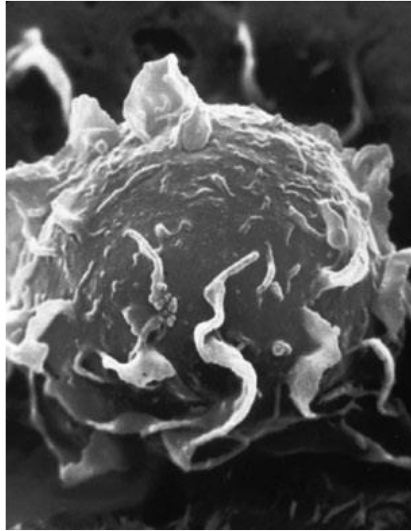
BIOLOGIA CELULAR

da amostra. Consequentemente, para amostras biológicas, o limite prático da resolução do microscópio eletrônico é de 1 a 2 nm. Embora essa resolução seja muito menor que a predita simplesmente pelo comprimento de onda dos elétrons, ela representa um aumento de mais cem vezes na capacidade de resolução do microscópio ótico.

Dois tipos de microscopia eletrônica – transmissão e varredura – são amplamente utilizados para estudar as células. Em princípio, a microscopia eletrônica de transmissão é similar à observação de células coradas com o microscópio de campo claro. As amostras são fixadas e coradas com sais de metais pesados, que fornecem contraste através da dispersão de elétrons. Um feixe de elétrons é passado através da amostra e focado para formar uma imagem em uma tela fluorescente. Elétrons que encontram um íon de metal pesado quando passam através da amostra são defletidos e não contribuem para a imagem final, de maneira que áreas coradas da amostra aparecem escuras.

Amostras para serem examinadas por microscopia eletrônica de transmissão podem ser preparadas por coloração negativa ou positiva. Na coloração positiva, os tecidos da amostra são cortados em seções finas e corados com sais de metais pesados (como tetraóxido de ósmio, acetato de urânio e citrato de chumbo) que reagem com lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Esses íons de metais pesados ligam-se a uma variedade de estruturas celulares, que consequentemente aparecem escuras na imagem final. Um procedimento alternativo da coloração positiva pode ser usado também para identificar macromoléculas específicas dentro da célula. Por exemplo, anticorpos marcados com metais pesados eletro densos (como partículas de ouro) são frequentemente usados para determinar a localização subcelular de proteínas específicas com o microscópio eletrônico. Esse método é similar ao uso de anticorpos marcados com corantes fluorescentes na microscopia de fluorescência.

BIOLOGIA CELULAR



Microscopia eletrônica de varredura de um macrófago.

A coloração negativa é útil para a visualização de estruturas biológicas intactas, como uma bactéria, organelas subcelulares isoladas e macromoléculas. Nesse método, a amostra biológica é depositada sobre um filme de suporte, e um corante de metal pesado é seco ao redor da sua superfície. A amostra não-corada é coberta por um filme de corante eletro denso, produzindo uma imagem na qual a amostra aparece clara contra um fundo escuro corado.

O sombreamento metálico é outra técnica usada para visualizar a superfície de estruturas subcelulares isoladas ou macromoléculas com o microscópio eletrônico de transmissão (DE ROBERTS, 2006 apud BARRETO, 2014).

A amostra é coberta com uma fina camada de um metal vaporizado, como a platina. O metal é borrifado sobre a amostra em um ângulo tal que as superfícies da amostra em frente da fonte das moléculas de metal vaporizado são mais cobertas do que as outras. Esse revestimento diferencial cria um efeito de sombra, dando à amostra uma aparência tridimensional nas micrografias eletrônicas.

A preparação de amostras por criofratura, em combinação com o sombreamento metálico, tem sido particularmente importante nos estudos da estrutura de membranas. Amostras são congeladas em nitrogênio líquido (a -196°C) e então quebradas com uma lâmina não-cortante. Frequentemente, esse processo divide a bicamada de lipídeos, revelando a face interior da membrana celular. A amostra é então recoberta com platina, e o material biológico é dissolvido com ácido, produzindo uma réplica metálica da superfície da amostra. O exame dessas réplicas

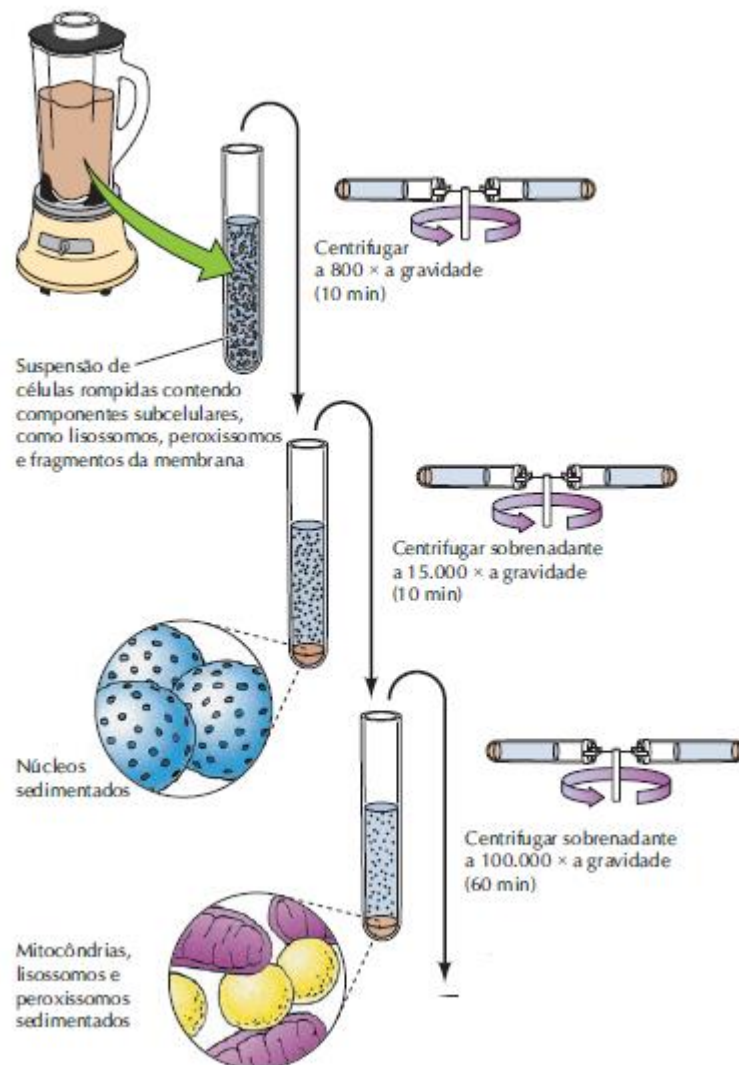
BIOLOGIA CELULAR

no microscópio eletrônico revela muitas alterações na superfície, correspondendo às proteínas que atravessam a bicamada de lipídeos. Uma variação da criofratura é chamada de esboço por congelamento, que permite, além das faces internas, a visualização das superfícies externas das membranas celulares.

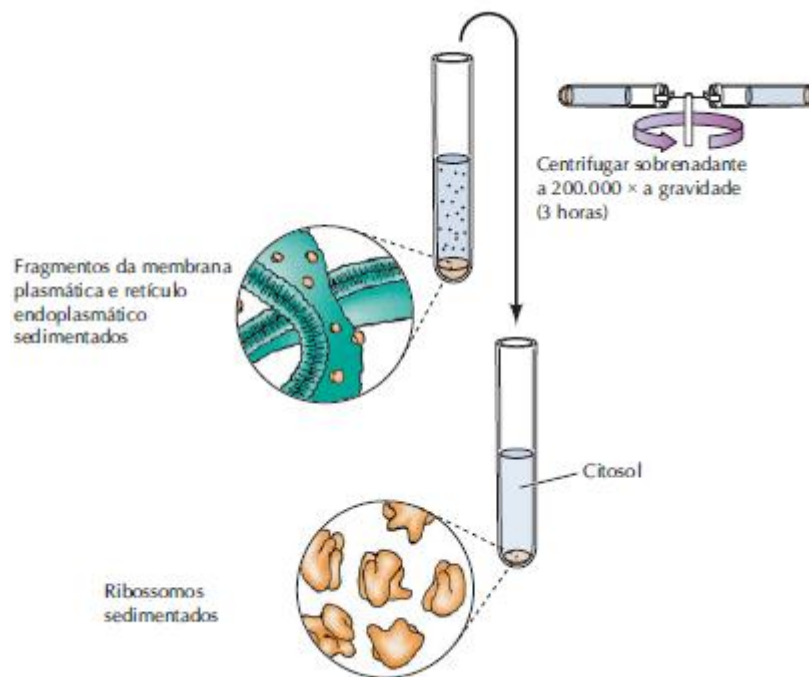
O segundo tipo de microscopia eletrônica, a microscopia eletrônica de varredura, é usado para dar uma imagem tridimensional das células. Na microscopia eletrônica de varredura, o feixe de elétrons não passa através da amostra. Em vez disso, a superfície da célula é coberta com um metal pesado, e um feixe de elétrons é usado para varrer a superfície da amostra. Elétrons que são dispersos ou emitidos a partir da superfície da amostra são detectados para gerarem uma imagem tridimensional conforme o feixe de elétrons move-se através da célula. Uma vez que a resolução da microscopia eletrônica de varredura é de somente 10 nm, seu uso é geralmente restrito ao estudo de células inteiras em vez de organelas subcelulares ou macromoléculas.

BIOLOGIA CELULAR

9.3 Fracionamento subcelular



BIOLOGIA CELULAR



Embora o microscópio eletrônico permita visualização detalhada da estrutura celular, a microscopia sozinha não é suficiente para definir as funções dos vários componentes de células eucarióticas. Para responder a muitas das questões concernentes às funções das organelas subcelulares, tem sido necessário isolar as organelas de células eucarióticas de modo que possam ser utilizadas para estudos bioquímicos. Isso é geralmente realizado por centrifugação diferencial – um método desenvolvido primariamente por Albert Claude, Christian de Duve e seus colegas nas décadas de 1940 e 1950 para separar componentes da célula com base em seus tamanhos e densidades.

A primeira etapa no fracionamento subcelular é a ruptura da membrana plasmática sob condições em que não ocorra a destruição dos componentes internos da célula. Diversos métodos são usados, incluindo sonicação (exposição a sons de alta frequência), trituração com homogeneizadores mecânicos ou tratamento com maceradores de alta velocidade (liquidificadores). Todos esses procedimentos quebram a membrana plasmática e o retículo endoplasmático em pequenos fragmentos, enquanto deixam intactos outros componentes da célula (como núcleo, lisossomos, peroxissomos, mitocôndrias e cloroplastos) (CHABREGAS, 2001 APUD COOPER, 2016).

A suspensão de células rompidas (chamada de lisado ou homogenato) é então fracionada em seus componentes por uma série de centrifugações em uma ultra centrífuga, que roda amostras em velocidades muito grandes (acima de 100.000 rpm)

BIOLOGIA CELULAR

para produzir forças até 500.000 vezes maiores que a gravidade. Essa força leva os

componentes celulares a moverem-se em direção ao fundo do tubo da centrífuga e

formarem um sedimento (um processo chamado de sedimentação) em uma velocidade que depende do seu tamanho e densidade, com as estruturas maiores e mais

pesadas sedimentando-se mais rapidamente. Geralmente, o homogenato celular é primeiro centrifugado a uma baixa velocidade, na qual sedimentam apenas as células não-lisadas e a maior estrutura subcelular – o núcleo. Então, uma fração enriquecida de núcleos pode ser recuperada do sedimento da centrifugação a uma baixa velocidade enquanto os outros componentes celulares permanecem no sobrenadante (a solução remanescente). O sobrenadante é então centrifugado a uma maior velocidade para sedimentar as mitocôndrias, os cloroplastos, os lisossomos e os peroxissomos. A recentrifugação do sobrenadante em velocidade ainda mais alta sedimenta fragmentos da membrana citoplasmática e o retículo endoplasmático. Uma quarta centrifugação, com velocidade ainda mais alta, sedimenta os ribossomos, deixando somente a porção solúvel do citoplasma (o citosol) no sobrenadante.

As frações obtidas pela centrifugação diferencial correspondem a preparações enriquecidas, mas ainda não-puras, de organelas. Um grau maior de purificação pode ser obtido por centrifugação em gradiente de densidade, na qual as organelas são separadas por sedimentação através de um gradiente de uma substância densa, como a sacarose. Na centrifugação por velocidade, o material de partida é colocado no topo do gradiente de sacarose. Partículas de diferentes tamanhos sedimentam através do gradiente em taxas diferentes, movendo-se como bandas definidas.

Após a centrifugação, a coleta das frações individuais do gradiente permite uma resolução suficiente para separar organelas de tamanhos semelhantes, como mitocôndrias, lisossomos e peroxissomos (CHABREGAS, 2001 APUD COOPER, 2016).

A centrifugação de equilíbrio em gradientes de densidade pode ser usada para separar componentes subcelulares com base nas suas densidades de flutuação, independentemente de seu tamanho ou forma. Neste processo, a amostra é centrifugada em um gradiente contendo alta concentração de sacarose ou cloreto de cézio. Em vez de serem separadas com base na velocidade de sedimentação, as

BIOLOGIA CELULAR

partículas da amostra são centrifugadas até atingirem uma posição de equilíbrio, na qual sua densidade é igual à da solução de sacarose ou cloreto de cézio. Essas centrifugações de equilíbrio são úteis na separação de diferentes tipos de membranas e são suficientemente sensíveis para separar macromoléculas que são marcadas com diferentes isótopos. Um exemplo clássico, discutido no Capítulo 3, é a análise da replicação do DNA através da separação de moléculas de DNA contendo isótopos pesados e leves de nitrogênio (^{15}N e ^{14}N) por centrifugação de equilíbrio em gradiente de cloreto de cézio.

9.4 Crescimento de células animais em cultura

A habilidade de estudar células depende muito de quão facilmente elas podem ser cultivadas e manipuladas em laboratório. Apesar do processo ser tecnicamente mais difícil do que cultivar bactérias ou leveduras, uma grande variedade de células de animais e plantas pode ser cultivada e manipulada em cultura. Esses sistemas de cultivo de células *in vitro* têm permitido que os cientistas estudem o crescimento e a diferenciação celular, bem como efetuem manipulações genéticas necessárias para a compreensão da estrutura e função dos genes.

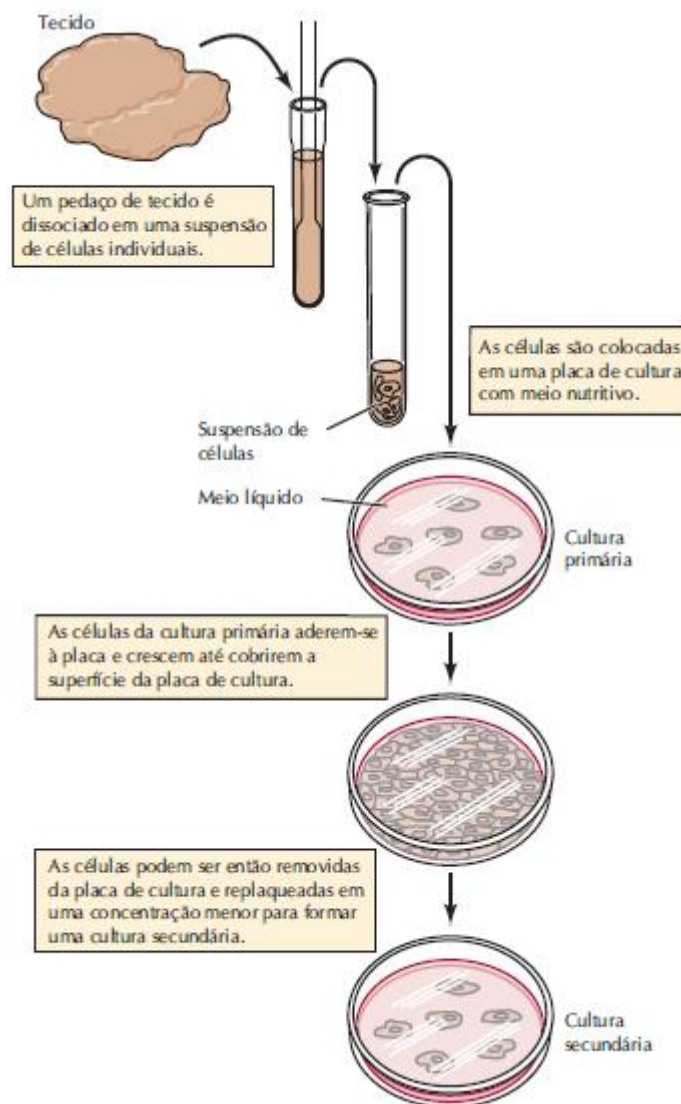
As culturas de células animais são iniciadas pelo isolamento de células a partir de pedaços de tecidos e, a seguir, as células são adicionadas em placas de cultivo contendo meio nutritivo. A maioria dos tipos de células animais, como fibroblastos e células epiteliais, adere-se e cresce na superfície plástica das placas usadas para cultivo de células (COOPER, 2016 apud ALVES, 2017).

Embriões e tumores são frequentemente usados como material de partida, já que eles contêm células de crescimento rápido. Particularmente, fibroblastos de embriões crescem muito bem em cultura e como consequência são um dos tipos mais amplamente estudados de células animais. Entretanto, sob condições apropriadas, muitos tipos de células especializadas também podem crescer em cultura, permitindo que suas propriedades diferenciadas possam ser estudadas em um ambiente experimental controlado.

As células-tronco embrionárias são um exemplo particularmente interessante. Essas células são estabelecidas em cultura a partir de embriões precoces e mantêm sua capacidade de diferenciar-se em todos os tipos de células presentes em

BIOLOGIA CELULAR

organismos adultos. Consequentemente, as células tronco embrionárias desempenham um papel importante no estudo das funções de muitos genes no desenvolvimento do camundongo, assim como oferecem a possibilidade de contribuir para o tratamento de doenças humanas, fornecendo uma fonte de tecidos para transplantoterapias.



Os meios de cultura necessários para a propagação de células animais são muito mais complexos que o meio mínimo suficiente para sustentar o crescimento de bactérias e leveduras. Os primeiros estudos de cultura celular utilizavam meios compostos de componentes indefinidos, como plasma, soro e extratos de embrião. Um importante avanço foi feito em 1955, quando Harry Eagle descreveu o primeiro meio definido que sustentava o crescimento de células animais. Além de sais e glicose, os meios usados para cultivo de células animais contêm vários aminoácidos e vitaminas, que as células não podem sintetizar.

BIOLOGIA CELULAR

O meio de crescimento para a maioria das células animais em cultura também inclui soro, que serve como fonte de fatores de crescimento necessários para estimular a divisão celular. Vários fatores de crescimento têm sido identificados (COOPER, 2016 apud ALVES, 2017).

Eles servem como reguladores essenciais para o crescimento e a diferenciação de células em organismos multicelulares, fornecendo sinais pelos quais células diferentes comunicam-se entre si. Por exemplo, uma importante função dos fibroblastos da pele no animal intacto é a proliferação quando for necessário reparar danos resultantes de um corte ou ferimento. A divisão é induzida por um fator de crescimento liberado por plaquetas durante a coagulação sanguínea, estimulando, desse modo, a proliferação de fibroblastos na região próxima ao tecido lesado. A identificação de fatores de crescimento específicos tem tornado possível a cultura de uma variedade de células em meio sem soro (meio no qual o soro é substituído por fatores de crescimento específicos necessários para a proliferação das células em questão).

As primeiras culturas celulares estabelecidas a partir de um tecido são chamadas de culturas primárias. As células em uma cultura primária geralmente crescem até cobrirem a superfície da placa de cultura. Então, elas devem ser removidas da placa e colocadas em uma nova placa com menor concentração de células para formar uma cultura secundária. Este processo pode ser repetido muitas vezes, mas a maioria das células normais não pode ser crescida em cultura indefinidamente. Por exemplo, fibroblastos humanos normais geralmente podem ser cultivados por 50 a 100 duplicações da população, após o que eles param de crescer e morrem.

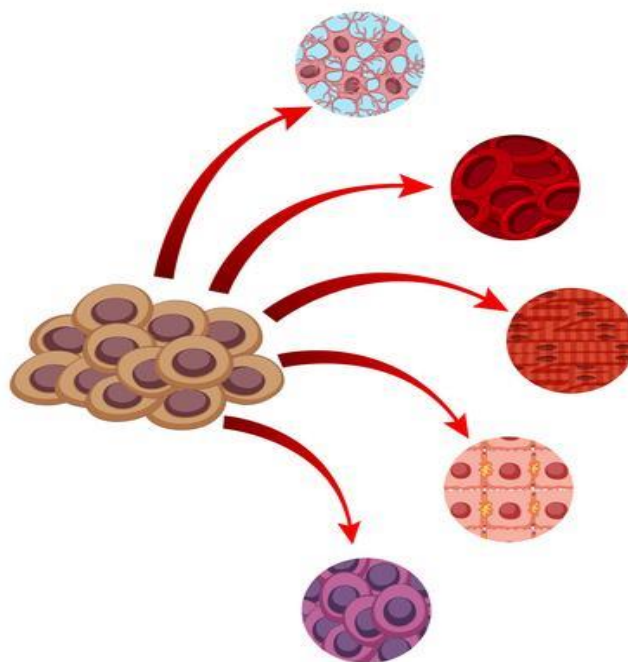
Em contraste, células-tronco embrionárias e células derivadas de tumores com frequência proliferam indefinidamente em cultura e são chamadas de linhagens de células imortalizadas ou permanentes. Além disso, uma variedade de linhagens de células imortalizadas de roedores tem sido isolada a partir de culturas de fibroblastos normais. Em vez de morrerem, como a maioria das suas companheiras, algumas poucas células dessas culturas continuam a proliferar indefinidamente, formando linhagens celulares como as derivadas de tumores. Essas linhagens de células permanentes têm sido muito úteis para vários tipos de experimentos porque fornecem uma fonte contínua e uniforme de células que podem ser manipuladas, clonadas e indefinidamente propagadas em laboratório. Mesmo sob condições ótimas, o tempo

BIOLOGIA CELULAR

de divisão das células animais com maior capacidade de crescimento é ao redor de 20 horas – dez vezes maior que o tempo de divisão das leveduras.

Consequentemente, experimentos com células animais cultivadas são mais difíceis e mais demorados que os com bactérias e leveduras. Por exemplo, o crescimento de uma colônia visível de células animais a partir de uma única célula demora uma semana ou mais, ao passo que colônias de *E. coli* ou leveduras demoram uma noite para crescerem a partir de uma única célula. Contudo, manipulações genéticas de células de animais em cultura têm sido indispensáveis para a compreensão da estrutura e função celular.

10 DIFERENCIAÇÃO CELULAR



Fonte: vecteezy.com

A evolução das espécies, ao longo de milhares de gerações, permitiu que organismos simples, unicelulares, se tornassem seres compostos por um número elevado de células, ou seja, serem multicelulares. Isso, em decorrência principalmente dos desafios e modificações oferecidas pela superfície e oceanos do planeta Terra.

BIOLOGIA CELULAR

Desta forma, a partir de uma célula precursora primordial proveniente de um brotamento ou após fecundação, ocorre intensa proliferação celular e o processo de diferenciação celular, o qual permite a especialização celular.

10.1 Diferenciação celular: especialização e diversidade

Durante a formação de um organismo multicelular complexo ocorrem basicamente quatro mecanismos universais do desenvolvimento animal: A proliferação celular a especialização celular a interação entre células o movimento celular (migração celular) conosco, seres humanos, acontece exatamente da mesma maneira.

Qualquer alteração que comprometa o processo de diferenciação celular tem como consequência a morte celular e uma nova tentativa ou compensação do processo de diferenciação, para que a estrutura final possa ser formada adequadamente, seja ela um órgão ou tecido. Para que uma célula precursora se torne uma célula terminalmente diferenciada é preciso que novas sequências do DNA sejam lidas e o produto desses genes, ou seja, novas proteínas, sejam expressas. Boa parte dessas proteínas formarão elementos estruturais que mudam a estrutura da célula. Sendo assim, a composição celular de microtúbulos, filamentos intermediários e filamentos de actina é modificado, à medida que novas unidades proteicas são adicionadas. Com essas mudanças, a morfologia da célula se altera.

Imaginemos uma célula precursora arredondada assumindo uma morfologia complexa como a de um neurônio que contém um corpo celular, axônios e dendritos. A modificação no padrão de expressão de genes de uma célula, durante o processo de diferenciação, envolve grandes alterações no padrão fisiológico dessas unidades. O produto da leitura desses novos genes também fornece à célula novas proteínas que serão direcionadas para a membrana plasmática ou ficarão contidas no citoplasma. Além disso, proteínas que são enzimas, com a capacidade de catalisar processos metabólicos elementares, viabilizam processos metabólicos específicos do fenótipo o qual a célula se tornará. Outra parte dessas novas proteínas, quando adsorvidas pela membrana plasmática, forma um grupo importante de elementos chamados de proteínas integrais de membrana.

BIOLOGIA CELULAR

Dentre esse grupo de proteínas, existem os receptores, que basicamente se dividem em três subpopulações de membrana plasmática, os receptores acoplados à proteína G, os receptores/canais iônicos e os receptores do tipo tirosina cinase (como foi visto nos capítulos anteriores). Cada um desses receptores se comporta de maneira diferente quando ativados por um ligante. Quando esse elemento externo chamado ligante se associa ao receptor específico, ativa o receptor que, por sua vez, se acopla a uma proteína G (excitatória ou inibitória) presente na face interna da membrana plasmática. Essa ligação permite então: a abertura de um canal iônico, a ativação de uma via de sinalização ou a modulação da atividade de uma enzima. Os receptores do tipo canal iônico por sua vez, ao serem ativados por ligante, possuem um poro na sua estrutura que permite a passagem de um íon específico e assim há uma alteração fisiológica na célula. Já o receptor do tipo tirosina cinase possui, no seu domínio intracelular, uma sequência de aminoácidos que constituem uma enzima com capacidade, geralmente, de fosforilar sítios específicos de elementos proteicos contidos no citoplasma celular (SPIEGEL, 1994 apud HAUACHE, 2001).

Existem outras proteínas direcionadas à membrana plasmática que atuam como canais iônicos e permitem o fluxo de íons de maneira específica na célula terminalmente diferenciada. Além disso, outras proteínas recém-sintetizadas devido a diferenciação, podem agir na membrana plasmática como um elemento regulatório da fluidez da membrana. Parte desses novos elementos produzidos a partir da diferenciação celular pode ser direcionada ao meio extracelular, isto é, eles são exportados através de secreção celular.

Outra parte do produto do novo padrão de expressão gênica é constituída por elementos distintos e solúveis no citoplasma que, quando alinhados, formam as diversas vias de sinalização intracelular.

Uma célula ao se diferenciar adquire diversos elementos que se organizam formando as inúmeras vias de sinalização existentes em uma célula madura. De maneira geral, cada via de sinalização exerce um efeito específico sobre a célula podendo modular funções no citoplasma, no núcleo celular e, em alguns casos, na própria membrana plasmática, na qual a via de sinalização foi ativada.

A alteração nas características de uma célula, durante o processo de diferenciação, passa também pela modificação no perfil de açúcares e lipídeos. Estes, por sua vez, têm um padrão de produção alterado à medida que enzimas específicas de síntese ou degradação dessas moléculas são produzidas com alteração no padrão de expressão gênica. Assim, os padrões de glicosilação e formação de glicoconjugados, a síntese de lipídeos adicionados à membrana plasmática, bem como a formação de glicolipídeos contribuem para a modificação da célula com a diferenciação celular. Todas as características descritas acima constituem o processo

BIOLOGIA CELULAR

de diferenciação celular. Boa parte dos processos iniciais de diferenciação celular ocorre durante o desenvolvimento embrionário, no qual as estruturas do organismo multicelular ainda são rudimentares.

Devemos nos perguntar também, o que faz essa célula se transformar, por exemplo, em um fibroblasto em vez de se transformar em um neurônio? Certamente, o ambiente em que essa célula se encontra é muito importante para que esses padrões se definam. Mas existem também características intrínsecas, de um grupo de células precursoras que também determinam um caminho natural de diferenciação o qual essa célula pode seguir até a sua diferenciação terminal (SÁ, 2014).

Há, no programa genético, uma combinação de fatores que geram um resultado final. O ambiente influencia a diferenciação através da sinalização por pequenas moléculas, geralmente pequenos peptídeos, chamados de fatores de transformação, que se ligam a um receptor específico. Esse receptor ativado aciona uma via de sinalização que direciona uma mensagem para o núcleo celular.

Uma vez sinalizado, o núcleo celular ativa elementos chamados de fatores de transcrição. Como bem diz o nome, esses fatores, por sua vez, vão permitir a transcrição de sequências específicas de DNA, os chamados genes, cujas mensagens irão codificar sinais em forma de pequenos peptídeos capazes de induzir leitura ou repressão de outros genes. Um mesmo fator de transcrição induzido em células precursoras diferentes ou em estágios diferentes de diferenciação da mesma célula, podem controlar a "desrepressão" ou repressão de genes diferentes.

Isso certamente reflete uma estratégia da natureza para que, a partir de um mesmo elemento possam ocorrer diferentes fenômenos moduladores sobre uma sequência de nucleotídeos do DNA. Acontece que, mesmo não havendo a presença de um fator indutor, capaz de ativar um receptor que induza a diferenciação de uma célula precursora para um fenótipo A, haverá a diferenciação natural dessa célula precursora para um fenótipo B. Isso devido a características intrínsecas do programa nuclear da célula precursora.

Existe um padrão de diferenciação intrínseco dessa célula precursora, independente de sinais do meio externo. Um termo do inglês comumente utilizado para definir essa característica é *default*. Nada mais do que um padrão. Isso nos leva a imaginar que para a diversidade de tipos celulares existentes em organismos multicelulares, deva existir um número expressivo de células precursoras, e isso é totalmente correto. Desta forma, há um controle refinado ao longo do desenvolvimento

BIOLOGIA CELULAR

embrionário sobre a geração da diversidade celular. Este aspecto será bem esclarecido no tópico sobre a biologia das células-tronco e a geração de células precursoras.

Se imaginarmos os estágios bem iniciais do desenvolvimento embrionário, logo nos perguntaremos: Como um sistema de sinalização tão robusto poderia ocorrer entre células em número tão reduzido e ainda em um estágio tão rudimentar? Na verdade, esse é um sistema de sinalização dependente do contato célula-célula, o que é relativamente simples se compararmos a secreção de morfógenos, sinalização através de uma sinapse ou um mecanismo endócrino. E ele se propõe apenas a reprimir o curso natural de uma célula precursora, que é a diferenciação. Não podemos esquecer que, na ausência de sinais indutores, sejam eles quais forem, as células precursoras têm um programa intrínseco de diferenciação pré-determinado. Para esclarecer este questionamento dois aspectos devem ser mencionados:

- A capacidade secretória de células nos estágios iniciais do desenvolvimento, isto é, durante as clivagens, é muito reduzida ou inexistente.
- A sinalização entre células ocorre por contato célula-célula, de forma que, tanto o ligante como o receptor estão ancorados à membrana plasmática. Através do contato célula-célula ocorre um fenômeno chamado de inibição lateral.

Este fenômeno consiste na interação de um ligante com o seu receptor, sendo que ambos estão presentes na superfície de cada uma das células. Essa interação mantém as células no seu estado indiferenciado, em decorrência da repressão de genes que promovem diferenciação celular.

Em um dado momento, com a progressão do desenvolvimento embrionário, uma das células passa a expressar uma quantidade maior do ligante, passando a exercer um efeito inibitório mais intenso sobre a célula vizinha. Ao mesmo tempo, essa mesma célula se torna resistente ao efeito inibitório induzido pela célula vizinha, à medida que o seu receptor perde a sensibilidade ao ligante. O resultado dessa mudança é que cada uma das células, que inicialmente eram iguais, se diferenciam em fenótipos distintos.

Com a progressão do desenvolvimento embrionário e o surgimento de uma matriz extracelular rudimentar, as células se tornam mais amadurecidas e adquirem a capacidade de secretar pequenas moléculas que se concentram no

BIOLOGIA CELULAR

meio externo formando um gradiente de concentração (KRAUSE, 2001 apud SÁ, 2014).

Algumas destas moléculas têm a capacidade de induzir a diferenciação das células vizinha, desde que elas tenham o receptor para essa molécula que é chamada de morfógeno. Uma molécula secretada por uma célula, forma um concentrado maior em regiões mais próximas da fonte do que a algumas células de distância. Essa diferença de concentração é percebida pelas células da vizinhança e esse gradiente faz com que o morfógeno seja um indutor de diferenciação celular, desde que haja uma concentração mínima suficiente para induzir o fenômeno. Em suma, variações de concentração também são importantes para definir se haverá diferenciação celular para o tipo celular A, B ou C de acordo com o potencial de sensibilização da célula precursora.

Recentemente, foi demonstrado que algumas moléculas com papéis biológicos bem elucidados, fora do contexto de diferenciação celular, podem se comportar como moléculas indutoras de diferenciação celular em um período específico da formação de um órgão ou tecido. Isso demonstra novos papéis biológicos para moléculas já caracterizadas há algumas décadas. A comunicação entre células pode ocorrer de quatro formas básicas, sendo elas: O contato célula-célula – demonstrado no efeito de inibição lateral; A comunicação parácrina – uma molécula secretada por uma célula exerce seu efeito sobre as células vizinhas, como demonstrado no exemplo sobre o efeito do gradiente de concentração de uma molécula; A comunicação através de um hormônio – no qual uma molécula secretada por um grupo de células, obrigatoriamente, cai na corrente sanguínea e exerce seu efeito sobre um grupo de células pertencentes a outro órgão e tecido.

10.2 A biologia das células tronco

Ao longo dos anos, diversos órgãos e tecidos do corpo humano perdem progressivamente sua capacidade de funcionamento, seja por causa de alguma doença ou pelo processo normal de envelhecimento. Há então uma grande demanda de reposição desses órgãos, que hoje em dia é atendida por programas de transplante de órgãos. No entanto, por várias razões, esses programas de transplante de órgãos atendem a uma fração muito pequena dos pacientes (5% a 10% nos Estados Unidos),

BIOLOGIA CELULAR

seja por escassez de doadores ou pela atual incapacidade de transplante de certos órgãos ou tecidos, como muscular e nervoso. Além disso, os transplantes de órgãos existentes têm um alto custo, o que é de particular importância para a saúde pública no Brasil, onde são pagos pelo Ministério da Saúde.

Dentro desse contexto, as células-tronco se apresentam como uma fonte potencialmente ilimitada de tecidos para transplante. Células-tronco (CT) podem ser definidas como células com (I) grande capacidade de proliferação e auto renovação, (II) capacidade de responder a estímulos externos e dar origem a diferentes linhagens celulares mais especializados. Assim, teoricamente, estas células poderiam ser multiplicadas no laboratório e induzidas a formar tipos celulares específicos que, quando transplantados, regenerariam o órgão doente. O impacto econômico desta "medicina regenerativa" (KRAUSE, 2001 apud PEREIRA, 2008).

A célula-tronco, por definição, é uma célula com capacidade de se autorrenovar através de um processo chamado de divisão assimétrica. Para entender o que é divisão assimétrica podemos compará-la com a divisão simétrica, onde uma célula sofre mitose dando origem a duas células idênticas. Na divisão assimétrica, a célula-mãe dá origem a duas células diferentes. Durante divisão de uma célula-tronco, ocorre a formação de uma cópia idêntica à célula-mãe e a outra célula que é chamada de amplificadora transitória. Desta forma, uma célula-tronco tem a capacidade de sofrer autorrenovação para que a população de células tronco seja preservada, durante o desenvolvimento embrionário, durante o crescimento pós-natal e mesmo durante a fase adulta. Observações experimentais com culturas de células-tronco, utilizando uma estratégia de reconhecimento do DNA recém-sintetizado, demonstra que, durante o processo de autorrenovação de uma célula-tronco, o DNA da célula mãe é integralmente transferido para a célula-filha que é a sua cópia idêntica. Sendo assim, a célula amplificadora transitória contém, não apenas 50% de DNA novo, como ocorre em células derivadas de uma divisão simétrica, mas sim, um DNA 100% novo.

Este fenômeno ocorre porque as cromátides do núcleo de uma célula-tronco são imortalizadas e se alinham totalmente apenas de um lado do fuso mitótico, durante a fase de mitose (M) do ciclo celular. Este mecanismo é uma estratégia muito importante da natureza para minimizar ao máximo a possibilidade de mutações que modifiquem definitivamente o genoma de uma população de células. Isso porque, a célula precursora fundamental (a célula-tronco) sempre conservará o genoma ancestral. A célula amplificadora transitória, por definição, é a célula-filha de uma célula-tronco, que possui alta capacidade proliferativa e que pode dar origem às

BIOLOGIA CELULAR

células precursoras comprometidas com o fenótipo celular de um tecido específico. Seja ele tecido embrionário, muscular, nervoso, hepático ou epitelial, dentre todos os demais que dão suporte ao desenvolvimento embrionário ou que formam um indivíduo adulto. Isso significa que uma célula-tronco, por mais que tenha uma taxa de proliferação lenta (isto é, progressão lenta de ciclo celular), a medida que ela sofre autorrenovação, um número exponencialmente maior de células precursoras é formado. O número exato de células precursoras depende, diretamente, da demanda que um tecido tenha em um dado momento da sua formação ou da renovação tecidual na fase adulta.

A célula amplificadora transitória dá origem às células precursoras que por consequência vão se tornar uma célula terminalmente diferenciada. Este processo de transformação ocorre por diferenciação celular e envolve todos os mecanismos descritos no tópico anterior. No momento em que células-tronco se diferenciaram em células precursoras, dois fatores indicam quais fenótipos surgem.

Potencialidade da célula-tronco – quanto maior for a potencialidade de uma célula-tronco maior é o número de tipos (fenótipos) celulares gerados. Isso já abre um precedente para imaginarmos que existem tipos diferentes de células-tronco.

Ambiente que a célula precursora se encontra – cada ambiente fornece uma composição de fatores que direciona a diferenciação para tipos celulares distintos, como descrito anteriormente.

Dentro deste contexto, um aspecto importante sobre a conservação de células-tronco é a capacidade de uma porcentagem pequena das células de um tecido (em torno de 0,1 a 0,001% dependendo do órgão ou tecido) de se manterem como células-tronco em uma região muito bem definida do tecido. Essa habilidade permite que, o número de amplificadores transitórios e consequentemente células precursoras, sejam gerados de acordo com a necessidade do tecido adulto de renovar células que naturalmente morrem após cumprirem o seu papel biológico. Isso sugere uma relação direta entre a presença de célula-tronco e a capacidade de renovação celular de um órgão ou tecido.

As CTs adultas que mais conhecemos são os presentes na medula óssea, que desde a década de 1950 são utilizadas no tratamento de diferentes doenças que afetam o sistema hematopoiético. Na medula óssea, encontram-se CTs hematopoiéticas, que podem dar origem a todos os diferentes tipos de células do sangue (linfócitos, hemácias, plaquetas, etc.) (BARKER, 2003 apud PEREIRA, 2008).

BIOLOGIA CELULAR

As CTs estão presentes em muitos tecidos adultos, onde atuam na manutenção dos mesmos, repondo células mortas. Porém, as CTs presentes no adulto eram vistas tradicionalmente como restritas em seu potencial de diferenciação a somente células do tecido onde elas residem. Por exemplo, as CTs hematopoiéticas são capazes de regenerar o sangue após destruição daquele tecido por irradiação, e células do fígado proliferam na tentativa de regenerar aquele órgão. Porém, nos últimos anos, uma série de trabalhos vem questionando essa visão tradicional das CTs adultas, mostrando indicações de um potencial muito mais amplo de diferenciação, sendo capazes de dar origem a tecidos diferentes daqueles onde elas residem.

Uma das primeiras indicações de que as CTs da medula óssea poderiam se diferenciar em tecidos diferentes do hematopoiético veio de um estudo com um modelo animal para distrofia muscular de Duchenne, doença muscular degenerativa causada por mutações no gene da distrofina, uma proteína da parede muscular (GUSSONI, 1999 apud PEREIRA, 2008).

Animais afetados, ou seja, que não produzem a distrofina, foram submetidos a um transplante de medula óssea de camundongos normais. Além de terem sua medula óssea regenerada pelas células do doador, algumas semanas após o transplante, os animais transplantados apresentaram até 10% das fibras musculares contendo aquela proteína. Isto indicava que células derivadas da medula óssea do doador haviam se incorporado ao músculo dos animais distróficos.

Dois anos mais tarde, outro grupo conseguiu demonstrar que na medula óssea do camundongo existem células com uma enorme capacidade de diferenciação *in vivo*. Quando injetadas em camundongos receptores, estas CTs derivadas da medula óssea se diferenciaram em células epiteliais do fígado, pulmão, trato gastrointestinal e pele, além é claro de células hematopoiéticas no receptor. Este trabalho representou uma grande quebra de paradigma, e levou vários grupos a explorarem a capacidade terapêutica das CTs da medula óssea em doenças não hematológicas.

Neste sentido, uma das áreas mais exploradas tem sido a cardiologia. Estudos pré-clínicos com modelos animais avaliaram a capacidade terapêutica das células da medula óssea no tratamento de infarto do miocárdio induzido (ORLIC, 2001 apud PEREIRA, 2008).

Quando injetadas na parede do infarto logo após a ligação da coronária, as CTs de medula óssea promoveram a formação de novo músculo cardíaco que ocupava até 68% da porção infartada do ventrículo. Esse trabalho indicou que a administração

BIOLOGIA CELULAR

local de células da medula óssea pode levar à geração de novo miocárdio, aliviando o efeito da doença coronária.

Os resultados do uso de CTs da medula óssea em cardiopatias em modelo animais justificaram o início de testes em seres humanos. Em um trabalho desenvolvido numa parceria entre a UFRJ, o Hospital Pró-Cardíaco e a Universidade do Texas, catorze pacientes com doença isquêmica grave do coração receberam injeções de células de sua própria medula óssea diretamente no coração. Os resultados mostraram uma melhora significativa da função contrátil nos pacientes tratados quando comparados com controles após quatro meses do tratamento. Em 2005, foi iniciado no Brasil um teste clínico em larga escala, financiado pelo Ministério da Saúde, onde 1.200 pacientes com diferentes cardiopatias receberão injeções locais de células mononucleares derivadas da própria medula óssea. O estudo pretende avaliar a segurança e eficácia deste tratamento para eventualmente oferecê-lo à população como uma alternativa ao transplante cardíaco. Apesar destes e outros trabalhos indicarem uma maior plasticidade das CTs da medula óssea, incluindo também a capacidade destas células se diferenciarem em neurônios e hepatócitos, ainda não está claro se de fato aquelas células estão se transformando em outros tecidos ou se simplesmente estão se fundindo com células daqueles tecidos. Outros trabalhos, ainda, propõem um terceiro mecanismo para o efeito terapêutico das CTs da medula óssea, onde estas estariam secretando fatores que induziriam um processo natural de regeneração do órgão afetado. Fato é que o mecanismo pelo qual as CTs adultas exercem o efeito terapêutico observado em algumas doenças não hematológicas ainda não é conhecido e é tema de controvérsia na comunidade científica.

Enquanto a controvérsia não é resolvida, alguns estudos apresentam evidências indiretas da capacidade de diferenciação mais ampla das células da medula óssea em humanos. Por exemplo, mulheres com leucemia que receberam transplante de medula óssea de doadores homens apresentaram células contendo o cromossomo Y (ou seja, derivadas da medula óssea do doador) em seu cérebro (MEZEY, 2003 apud PEREIRA, 2008).

Além disso, uma pequena proporção (até 0,07%) havia se diferenciado em neurônios. Esse trabalho demonstrou a capacidade, ainda que com baixa eficiência, das células da medula óssea de entrar no cérebro e gerar neurônios, fenômeno também observado em camundongos. Se esta capacidade puder ser aumentada, um

BIOLOGIA CELULAR

dia as CTs de medula óssea poderão ser utilizadas no tratamento de doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer.

A potencialidade das células-tronco: totipotência, pluripotência, multipotência

Um dos fenômenos mais espetaculares da Biologia Celular, desde que organismos multicelulares complexos passaram a habitar a superfície da Terra, é a capacidade de uma célula fundamental formar trilhões de células com mais de cem fenótipos distintos. E esses tipos celulares ainda são capazes de se organizar perfeitamente em grupos capazes de formar órgãos e sistemas independentes que operam em perfeita sincronia com outros órgãos e tecidos do mesmo organismo.

Para entendermos com clareza os diferentes tipos de células-tronco e sua potencialidade continuaremos o enfoque no desenvolvimento embrionário e à fase adulta de mamíferos. Essa sugestão se deve, pois, os melhores exemplos didáticos são encontrados analisando espécies dessa classe.

A geração da primeira célula-tronco de um mamífero se dá através da fecundação, antes disto, ocorre a gametogênese em espécies que são férteis. A fecundação permite a soma dessas cargas cromossomais através da fusão dos pró-núcleos, dando origem ao zigoto.

- Gametogênese Formação do óvulo e do espermatozoide, ambos com carga cromossomal reduzida à metade (células haploides).
- Zigoto Célula primordial que potencialmente tem a capacidade de formar um indivíduo. Isso não apenas pela capacidade de dar origem a todas as células desse organismo, mas também pela capacidade de gerar células que formam estruturas que dão o suporte correto para o desenvolvimento embrionário. Essas células formam os anexos embrionários que, em mamíferos, são bem representados pela placenta. Por esse potencial de originar tanto as células que constituem o indivíduo quando as células que viabilizam a sua formação, o zigoto é chamado de célula-tronco totipotente.

A totipotência representa a maior potencialidade que uma célula-tronco possui. O período imediatamente após o surgimento do zigoto caracteriza a clivagem, na qual ocorrem as primeiras divisões celulares. Essas divisões celulares por mitose dão origem à mórula e à blástula. Neste período, ainda não

BIOLOGIA CELULAR

há diferenciação celular, no entanto, na fase seguinte, chamada de gastrulação, surge o blastocisto (COOPER, 2016 apud ZORZANELLI, 2017).

O blastocisto é composto por uma massa de células que sofreram o primeiro processo de diferenciação celular, em que, a massa de células que recobre essa estrutura arredondada está comprometida fenotipicamente para dar origem às células que formarão os anexos embrionários. A segunda população de células constitui a massa celular interna. A partir desta massa de células serão formados todos os órgãos e tecidos do novo indivíduo, inclusive as células germinativas imaturas que permitirão suas características de descendente fértil. Este aglomerado celular contém as células-tronco embrionárias. A massa celular interna é constituída por células-tronco embrionárias (as famosas), que têm o potencial de gerar todas as células de um indivíduo, menos aquelas células que formam os anexos embrionários.

Ainda durante a gastrulação (fase do desenvolvimento embrionário), ocorre o primeiro e o segundo processo de diferenciação das células-tronco embrionárias. Surge uma pequena região central, na massa celular interna, que contém as células precursoras que formarão as células germinativas, isto é, aquelas células que, no futuro, durante a fase adulta, garantirão a fertilidade do indivíduo. 2 Através do processo de diferenciação, juntamente com intensos movimentos migratórios, surgem os três folhetos germinativos (ou folhetos embrionários). Estas estruturas, derivadas das células-tronco embrionárias, são denominadas de: ectoderme, mesoderme, endoderme.

Essa potencialidade é reduzida, pois as células-tronco, que constituem os folhetos germinativos, estão comprometidas com a diferenciação em um número menor de células, se comparadas à célula-tronco totipotente (Zigoto) ou à célula-tronco pluripotente (célula-tronco embrionária).

Por esse motivo as células-tronco, contidas nos diferentes folhetos germinativos, são chamadas de multipotentes. Mesmo com a sua potencialidade reduzida, as células-tronco multipotentes dão origem a um grande número de células terminalmente diferenciadas (BYDLOWSKI, 2009 apud SÁ, 2014).

No entanto, elas estão comprometidas com um grupo específico de órgãos e tecidos.

- Células-tronco multipotentes ectoderma originam células do sistema nervoso e pele.

BIOLOGIA CELULAR

- Mesoderma originam células do sistema circulatório (coração e vasos sanguíneos).
- Endoderma originam células que formam os órgãos do trato gastrointestinal, bem como os ossos e cartilagens.

Se imaginarmos o número de tipos celulares, que geralmente constituem cada órgão ou tecido, teremos a percepção clara de que, apesar da perda de potencialidade, as células tronco multipotentes têm grande importância neste contexto biológico ao originar tipos celulares através de autorrenovação e diferenciação em amplificadoras transitórias. À medida que o desenvolvimento embrionário avança, após o surgimento dos folhetos germinativos, aumenta-se o número de células e o número de fenótipos celulares terminalmente diferenciados. Porém, essa progressão não limita a existência e a funcionalidade das células-tronco. Mas, sem dúvida, cada célula-tronco remanescente em um período mais adiante do desenvolvimento, apresenta uma potencialidade reduzida. Ao se atingir períodos tardios do desenvolvimento, boa parte dos mais de cem tipos celulares existentes em mamíferos, já está diferenciada, ainda que eles não estejam totalmente amadurecidos.

Ao término do cumprimento do seu papel biológico, durante o desenvolvimento embrionário, as células de suporte morrem por apoptose ou diferenciam-se terminalmente. Assim, elas cedem seus elementos estruturais viabilizando o surgimento de novas células ou assumem características celulares que contribuem para a funcionalidade do tecido maduro. As células-tronco remanescentes, chamadas de células-tronco oligopotentes dispõem do papel fundamental de suprir a demanda por células que morreram por apoptose após cumprirem sua função no tecido embrionário. Essas células-tronco têm sua potencialidade ainda mais reduzida se comparadas às células-tronco multipotentes. O papel biológico de células-tronco multi/oligopotentes segue além do período embrionário, já que os processos de renovação tecidual ocorrem efetivamente, não em todos, mas em boa parte dos tecidos adultos que mantêm um nicho contendo células-tronco. As células-tronco, no indivíduo adulto, e a renovação tecidual serão nossa próxima abordagem.

10.3 Terapias celulares: estratégias experimentais utilizando células-tronco, segundo SÁ, 2014.

As células-tronco, com diferentes potencialidades, têm sido isoladas e mantidas em cultura seguindo protocolos específicos que atendem às necessidades de cultivo para células pluripotentes e multipotentes. Algumas dessas populações celulares ao perderem a senescência, que significa proliferarem de maneira indefinida, sem perder a característica de células-tronco, se tornam linhagem celulares imortalizadas. A geração da primeira linhagem de células-tronco embrionárias pluripotentes de humanos foi obtida em 1998, pelo pesquisador americano James Thomson.

Outras linhagens de células-tronco embrionárias foram obtidas, inclusive por pesquisadores brasileiros. Por se tratarem de células pluripotentes, as células-tronco embrionárias podem se diferenciar em qualquer tipo celular do organismo. Inicialmente, quando mantidas em um ambiente de cultivo que mimetiza o ambiente original do qual elas derivaram, a massa celular interna do blastocisto, essas células formam colônias individuais que se mantêm aderidas a um tapete de fibroblastos. Na presença de dois fatores de crescimento, o fator de crescimento epidermal (do inglês, epidermal growth factor, EGF) e o fator de crescimento de fibroblastos básico (do inglês, basic fibroblast growth factor, bFGF) as células-tronco embrionárias se mantêm indiferenciadas em cultura. Ao se remover EGF e bFGF do meio de cultivo e adicionar uma combinação específica de fatores de crescimento e diferenciação é possível direcionar a diferenciação dessas células para um fenótipo específico.

Em teoria, após a diferenciação das células-tronco embrionárias, in vitro, seria possível injetar essas células em uma região onde houvesse a perda de células em decorrência de um insulto.

Outra possibilidade que também tem sido vastamente testada é a injeção direta das células-tronco embrionárias, sem diferenciação prévia, no local no qual há uma lesão ou doença do tecido.

Essa estratégia apresenta resultados melhores e, de fato, o ambiente onde essas células são injetadas, rico em moléculas indutoras, pode promover a diferenciação em células que foram perdidas em função da doença ou lesão. Porém, uma característica negativa das células-tronco embrionárias é a propensão para formar tumores no local em que foram injetadas (COOPER, 2016 apud ZORZANELLI, 2017).

BIOLOGIA CELULAR

Muitos estudos observaram a formação de teratomas, algumas semanas após a injeção das células em modelos experimentais utilizando-se ratos e camundongos. Certamente, se levarmos em consideração o grande número de estudos utilizando-se células-tronco embrionárias observaremos resultados positivos e convincentes acerca da eficácia na reposição de células e recuperação funcional.

Com relação à utilização das células-tronco multipotentes adultas (tecido específicas), em terapias para reposição de células, testes semelhantes aos utilizados com células-tronco embrionárias foram realizados em modelos experimentais utilizando-se roedores e primatas. Da mesma forma, a porcentagem de células pré-diferenciadas que, de fato, se integram ao tecido doente é muito pequena em relação ao número de células injetadas. Além disso, essas células-tronco apresentam uma grande dificuldade para expandir em cultura, o que torna o seu custo de cultivo muito elevado, em função do gasto com meio de cultivo e fatores de crescimento que sustentam essas células artificialmente vivas e proliferantes. Apesar de os avanços das pesquisas com células-tronco multipotentes adultas, a maior aplicação, em terapias celulares, continua sendo o transplante de medula óssea.

Há uma segunda grande linha de pesquisas utilizando-se de terapias celulares, que em vez de tentar substituir células que foram perdidas, se propõe a dar o suporte ideal para que não ocorra a perda de células. Células essas que, potencialmente, podem morrer em decorrência da progressão de uma doença degenerativa ou devido à injúria causada por uma lesão. Este suporte consiste em garantir a qualidade do microambiente, até então hostil, em função das alterações sofridas pelo tecido doente.

Falta de perfusão sanguínea adequada por causa de uma isquemia (infarto do miocárdio ou acidente vascular cerebral, o AVC) e a toxicidade do ambiente extracelular, em função da morte de células por apoptose ou necrose, são exemplos de alterações sofridas pelo tecido doente.

Esta toxicidade do ambiente debilitado pode ser exemplificada quando neurônios excitatórios do córtex cerebral, comprometidos pelo AVC, morrem e liberam o seu neurotransmissor no ambiente tecidual. Este neurotransmissor, o glutamato, em altas concentrações é tóxico e provoca a morte de uma segunda população de neurônios que não foram diretamente acometidos pela falta de perfusão sanguínea ocorrida pelo AVC.

BIOLOGIA CELULAR

As células-tronco multipotentes têm sido utilizadas em exemplos como esses e, em vez de substituírem células, elas previnem a progressão de uma lesão ou doença. Para a prevenção do desenvolvimento de uma doença, são liberadas pequenas moléculas, chamadas de fatores tróficos, que induzem a sobrevivência das células e inibem a morte celular (COOPER, 2016 apud ZORZANELLI, 2017)

Além disso, essas células também promovem a captura de moléculas tóxicas (como o glutamato), no microambiente, modulam a atividade do sistema imune para que suas células não causem danos teciduais ainda maiores e secretam fatores solúveis que induzem a formação de novos vasos sanguíneos. Por estes motivos, a terapia celular preventiva, tem se mostrado exequível, segura e eficaz, em modelos experimentais de laboratório, bem como em testes clínicos.

BIOLOGIA CELULAR

11 BIBLIOGRAFIA

- ALBERTS, J. L. *et al.* **Biologia molecular da célula**. 6ªed. Artmed. 2017.
- ALVES, E. A. GUIMARÃES, A. C. R. **Cultivo celular**. Cap. 5. Fiocruz, 2017.
- ANDERSSON, T. SICHERTZ-PONTEN, U. C. M. ALSMARK, R. M. PODOWSKI, A. K. NASLUND, A.- S. ERKSSON, H. H. WINKLER AND C. G. KURLAND. **The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria**. *Nature* 396: 133-140. [P], 1998.
- BARBOSA, H. S. REAL, S. C. **Biologia celular e ultraestrutura**. Cap. 1. Fiocruz, 2017.
- BARKER J.N, WAGNER J.E. **Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer**. *Nature Reviews* 2003; 3:526-532.
- BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de Citologia e Histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976. pp. 3, 10. 24.
- BYDLOWSKI, S. P. *et al.* **Células-tronco do líquido amniótico**. *Rev. Bras. Hematol.Hemoter.* vol.31 supl.1 São Paulo May 2009 Epub June 05, 2009.
- BORGES, J.C. **Micelas, Membranas e transporte**. Depto. de Química e Física Molecular – DQFM Instituto de Química de São Carlos – IQSC Universidade de São Paulo – USP, 2018.
- CARVALHO, H. F.; COLLARES-BUZATO, C. B. **Células: uma abordagem multidisciplinar**. Barueri: Manole, 2005. p. 248. 14.
- CHABREGAS, S. M. **Caracterização da localização subcelular da proteínaTHI1 de *Arabidopsis thaliana***. Tese apresentada a Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título em doutor em Agronomia. Piracicaba, SP, 2001.
- COOPER, M.G. HAUSMAN, R. E. **Uma Visão Geral das Células e da Pesquisa Celular**. 2016.

BIOLOGIA CELULAR

DE ROBERTIS, E. M. F.; HIB, J. **De Robertis Bases da Biologia celular e molecular**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 1. 15.

DE ROBERTIS, E. M. F.; HIB, J. **Bases da biologia celular e molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006

DÍAZ, J. L. F. **Evolução da cooperação, metabolismo e sua relação com a emergência da multicelularidade**. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Física. Recife, 2017.

GRAHAM, J. AND D. RICKWOOD. **Subcellular Fractionation: A Practical Approach**. New York: Oxford University Press. 1997.

GUSSONI E, SONEOKA Y, STRICKLAND C.D, BUZNEY E.A, KHAN MK, FLINT A.F, KUNKEL L.M, MULLIGAN RC. **Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation**. *Nature* 1999; 401:390-394.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. pp. 3-4, 14-15, 296

KAM, Z., E. ZAMIR, B. GEIGER. **Probing molecular processes in live cells by quantitative multidimensional microscopy**. *Trends Cell Biol.* 11: 329–334. [R], 2001.

KRAUSE D.S, THEISE N.D, COLLECTOR M.I, HENEGARIU O, HWANG S, GARDNER R, NEUTZEL S, SHARKIS S.J. **Multiorgan, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell**. *Cell* 2001;105:369-377.

LOTTENBERG, A. M. P. **Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular**. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol.53 no.5 São Paulo July 2009.

MANFIO, G. P. **Microrganismos**. Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas/ CPQBA – UNICAMP, 2018.

MELO, G. D. S., ALVES, L. D. A. **Dificuldades no processo de ensinoaprendizagem de Biologia Celular em iniciantes do curso de graduação em Ciências Bio-**

BIOLOGIA CELULAR

lógicas. 2011. 43f. Trabalho de Graduação Interdisciplinar (Curso de Ciências Biológicas). Centro De Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Presbiteriana Mackenzie. São Paulo – SP. 2011.

MENDES, M. A. A. **Produção e utilização de animações e vídeos no ensino de biologia celular para a primeira série do ensino médio**. 103f. Dissertação (Mestrado em Ensino de Ciências). Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Brasília. Brasília – DF. 2010.

MILLER, S. L. *et al.* **The origins of life on the earth'**, Concept of Modern biology series, 1974.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 4

PARKER, E. T., CLEAVES, H. J., DWORKIN, J. P., GLAVIN, D. P., CALLAHAN, M., AUBREY, A., LAZCANO, A. & BADA, J. L. **'Primordial synthesis of amines and amino acids in a 1958 miller h₂s-rich spark discharge experiment'**, Proceedings of the National Academy of Sciences **108**(14), 5526–5531, 2011.

PARKER, M. KAMENEV, A. **'Mean extinction time in predator-prey model'**, Journal of Statistical Physics **141**(2), 201–216, 2010.

PEIXOTO, P. H. P. **Biologia funcional e manejo de ecossistemas**. Programa de Pós-Graduação em Ecologia - UFJF DEPTO DE BOTANICA – ICB, 2017.

PEREIRA, L. V. **A importância do uso das células tronco para a saúde pública**. Ciência & Saúde Coletiva, **13**(1):7-14, 2008.

PORTER, K. R., A. CLAUDE AND E. F. FULLAM. **A study of tissue culture cells by electron microscopy**. *J. Exp. Med.* **81**: 233 246. [P] 1945.

RACANIELLO A. M. SKALKA. **Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control**. Washington, DC: ASM Press. 1999.

RAIMUNDO, R. L. S. **Avanços Conceituais em Biologia Celular mediados por WebQuests**. Dissertação apresentada à Comissão de Avaliação Prévia do Programa de Mestrado Profissional em Ensino de Ciências do Instituto de Ciências Exatas e

BIOLOGIA CELULAR

Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial à do título de Mestre em Ensino de Ciências. Ouro Preto, 2017.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia: texto e atlas, em correlação com Biologia celular e molecular**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. pp. 24, 104.

SÁ, A. B. BORGES, A.C. N. NACIFE, V. *et al.* **Introdução à Biologia Celular**. 1ª edição SESES Rio de Janeiro, 2014.

VENÂNCIO, M.A. **Integração metabólica e suas correlações**. Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico. Juiz de Fora, 2018.

ZORZANELLI, R. T. SPERONI, A. V. MENEZES, R. A. LEIBING, A. **Pesquisa com células-tronco no Brasil: a produção de um novo campo científico**. História, Ciências, Saúde – Manguinhos, Rio de Janeiro, 2017. v.24, n.1, jan-mar. 2017, p.129-144.